L'action des enzymes amylolytiques sur les grains d'amidon naturels, et la structure colloïdale de l'amidon

par

J. J. LYNST ZWIKKER.

Introduction.

Le point de départ de la présente étude réside dans l'observation suivante: on a remarqué que les grains d'amidon, dans leur état natural, non transformés en empois, se comportent d'une façon toute particulière — et qui diffère d'une espèce d'amidon à l'autre — en présence des liquides amylolytiques; la réaction qui intervient n'est pas la même — en apparence du moins — à l'intérieur de la cellule végétale et au cours des expériences exécutées in vitro; et même dans ces dernières, les différentes espèces d'amidon donnent encore des résultats différents.

C'est une opinion universellement reçue, depuis assez longtemps déjà, que les grains d'amidon sont enveloppés, chez toutes les espèces végétales, par une couche extérieure dont la composition diffère de celle de la partie interne des grains; cette couche externe oppose — tout au moins in vitro — une résistance considérable à l'action des ferments diastasiques. Cette influence de la couche externe n'est, d'autre part, pas également importante chez les différentes espèces d'amidon; plusieurs savants ont cherché à classer ces diverses espèces en une série, ordonnée d'après l'importance croissante de cette influence de la zône externe, mais sans arriver, jusqu'à présent, à des résultats ab-

solument concordants (Hammersten en 1871, Baranetzky en 1878, Lintner en 1890, Ling en 1903, Day en 1908). En règle générale, on peut dire que l'amidon des céréales est facilement attaqué par ces ferments, à l'état cru; les grains d'amidon du riz, au contraire, comme ceux de l'arrowroot et surtout ceux de la pomme de terre résistent énergiquement, tant qu'ils ne sont pas transformés en empois; dans le cas de la pomme de terre, Guérin-Varry signalait déjà le fait dès 1835.

Tous les chercheurs ci-dessus énumérés ont abouti à des conclusions qui concordent assez bien, dans les grandes lignes. Reichert, au contraire, dans son travail assez étendu sur la question, y défend un point de vue tout-à-fait personnel; cet auteur est d'avis que les grains d'amidon ne sont attaqués en aucune façon par les ferments tels que la diastase du malt ou la taca-diastase, la ptyaline et la pancréatine, aussi longtemps que ces grains sont intacts et qu'ils sont à l'abri de l'action des bactéries; ces vues ont été confirmées par les recherches expérimentales de cet auteur[1].

L'action de ces ferments additionnés d'une petite quantité de chloroforme comme antiseptique, se prolongea pendant plus de 12 mois et à la température optimale, sur diverses espèces d'amidon, sans provoquer la moindre érosion ou digestion. Reichert croit, en conséquence, que la plante vivante dispose d'autres moyens pour vaincre cette résistance des grains.

Ces résultats de Reichert sont néanmoins en contradiction directe avec ceux qu'avait obtenus Day[2] peu de temps auparavant; ce dernier avait cependant eu soin, lui aussi, d'éviter les influences perturbatrices dûes aux microbes, par l'addition de thymol. C'est pourquoi il nous a semblé qu'il y avait intérêt à reprendre ces recherches.

---

[1] Reichert. The differentiation and the specificity of starches in relation to Genera, Species, etc.. — Cette étude qui a paru en 1913 constitue le Bulletin No. 173 de la Carnegie Institution de Washington.

[2] Day. 1908. U. S. Dep. of Agriculture. Bullet. 202, p. 24 cité d'après Reichert.

Pour des raisons que nous ferons connaître plus loin, nous avons choisi comme matériel d'expérience l'amidon de la pomme de terre, du froment, de Canna et de la tulipe. Des quantités égales de ces quatre espèces d'amidon furent introduites dans l'étuve à culture, maintenue à la température de 30° environ, où nous les avons laissé macérer avec de la salive non diluée; cette liqueur possédait un pouvoir diastasique si énergique qu'elle décomposait instantanément la quantité égale d'amidon, préalablement gélifié (transformé en empois); cette décomposition était si complète que la réaction par l'iode était négative. Les expériences furent établies en deux séries, additionnées respectivement de chloroforme et de thymol.

Dans les deux cas, l'amidon de froment se trouva complètement décomposé après une nuit; le liquide ne ne colorait plus par l'iode; quant au précipité qui s'était déposé, l'examen microscopique y prouva l'absence totale de tout élément figuré.

Au bout de 2 jours, l'amidon de Canna était attaqué de façon visible. Les résultats de la réaction apparaissent cependant peu nettement à cause de la grande translucidité des grains; le phénomène devient au contraire très clair si l'on fait agir l'iode: les bords translucides restent incolores, ce qui prouve qu'ils ne contiennent plus de β-amylose.

L'amidon de pomme de terre ne laissait paraître encore, à ce moment, aucun changement Au bout de 5 jours, on voit que, pour l'amidon de Canna, tous les grains sont déjà digérés à moitié; beaucoup le sont même entièrement, c'est-à-dire qu'ils ne contiennent plus de β-amylose; l'α-amylose, en effet, n'est pas attaquée. Après le départ de la β-amylose, les grains d'amidon conservent encore si exactement la forme et l'aspect des grains intacts, qu'ils ne s'en distinguent guère que par une petite différence dans leur indice de réfraction de la lumière. Les grains digérés à moitié montrent que la zone d'attaque est limitée nettement par les couches concentriques. On peut apercevoir, par places, au milieu de la région incolore, une tache bleu au

contour très net: c'est une portion de grain, située entre deux cercles concentriques, qui a résisté.

Au bout de 10 jours, le précipité qui s'est déposé donne encore, sporadiquement, la coloration bleue par l'iode; nous n'avons jamais constaté, au cours de cette décomposition de l'amidon, qu'il se soit formé de l'érythrodextrine.

L'amidon de la tulipe donne à peu près les mêmes réactions de celui du Canna.

Quant à l'amidon de la pomme de terre, il est encore presqu'entièrement intact au bout d'une semaine.

L'attaque des grains les plus petits devient visible, soit sur tout le pourtour à la fois, soit d'abord d'un côté. Les grains volumineux sont, en ce moment, encore tout-à-fait intacts et ne commencent à subir l'influence du ferment qu'au cours des semaines suivantes; le ferment a besoin, d'ailleurs, d'un temps très long pour venir à bout de ces gros grains. On voit clairement que l'action du ferment diminue lentement mais de façon continue au fur et à mesure que les antiseptiques deviennent plus vieux et exercent, par le fait même, une influence de plus en plus nocive. De même que pour les amidons précédents, les grains de la pomme de terre conservent leur forme et leur aspect et l'attaque a lieu, en règle générale, sur tout le pourtour, suivant des lignes circulaires.

Nos expériences constituent donc une confirmation des essais de Day et des autres expérimentateurs; les résultats obtenus par Reichert doivent reposer sur une erreur. On ne peut guère admettre que ce dernier se soit laissé tromper par l'aspect extérieur des grains déjà digérés; nous devons donc forcément attribuer les résultats aberrants de ses expériences à l'inactivité relative de ses enzymes. Rappelons-nous combien de temps a nécessité l'attaque des grains par la salive, dont l'action diastasique est cependant si énergique, et dans laquelle le ferment se trouve dans les meilleures conditions possible; nous ne nous étonnerons plus, après cela, en constatant qu'une dilution au centième ($^1/_{100}$) des ferments préalablement isolés, et additionnés d'un antiseptique

qui peut ne pas être tout-à-fait inoffensif, n'a pas eu le temps d'agir suffisamment, pour permettre à l'expérimentateur de noter les résultats.

On est tenté d'attribuer, nous l'avons remarqué déjà plus haut, les différences qui se manifestent dans la résistance des grains d'amidon à la présence d'une couche enveloppante autour de ces grains, dont la composition chimique serait différente de celle des parties internes. Certains auteurs considèrent qu'elle est formée exclusivement d'α-amylose; d'autres pensent, au contraire, que d'autres substances combinées avec l'amidon y joueraient un rôle.

Jentys[1] est d'avis que, pour éviter une décomposition prématurée de ses substances de réserve par le suc cellulaire, la plante est capable, quand il y a lieu, de tanner l'amidon, utilisant ainsi pour ce faire l'antagonisme énergique bien connu qui existe entre l'action des tannins et de l'amylase. Cet auteur aurait obtenu, aux dépens de l'amidon pur, des produits qui donnent avec le chlorure de fer des réactions colorées; il aurait même réussi, en faisant agir le tannin sur une solution d'amylose, à obtenir des grains d'amidon artificiels dont la structure est identique à celle des plus beaux grains naturels. Ce sont là les arguments les plus importants apportés par Jentys, parmi toute une série d'autres d'ordre secondaire. Nous sommes à même de pouvoir confirmer la formation des grains d'amidon artificiels; l'argument qu'on peut en tirer est, cependant, à mon avis un peu faible; il faudrait, nous semble-t-il, démontrer d'abord, d'une façon précise, que les cercles concentriques des grains artificiels et naturels ont la même origine; or on sait que chez ceux-là, ces lignes circulaires sont dues à une précipitation par zone, et sont comparables aux anneaux de Liesegang. Quant à la manière de déceler les substances aromatiques, qui réagissent

[1] Jentys. Sur la nature chimique et la structure de l'amidon. Bull. Acad. Sc. de Cracovie. 1907, p. 203.

avec le chlorure de fer, Jentys en donne une description peu probante; voir à ce sujet le chap III.

Beyerinck[1] au contraire croit que la différence que l'on constate entre la paroi et le contenu des grains d'amidon est probablement basée sur une incrustation des albuminoïdes du leucoplaste dans l'amylose; ce mélange des deux substances constituerait un corps à caractères physiques très spéciaux. Cette interprétation cadrerait mieux avec cette remarque générale, à savoir que les substances incrustantes modifient fortement la solubilité des substances capables d'imbibition; les parois cellulaires lignifiées ou subérifiées, le cuir tanné nous en fournissent de bons exemples. Si cette interprétation est exacte la quantité des albuminoïdes ainsi incrustés serait, en tous cas, très faible. Beyerinck n'est pas parvenu, en effet, à déceler, par l'analyse chimique, la moindre différence dans la teneur en azote entre l'amidon et les utricules d'amidon de pommes de terre préalablement gélifié et débarrassé de la granulose par lavage.

Il est incontestable que si pareille interprétation contenait une part de vérité, une couche externe ainsi constituée pourrait opposer, par les modifications qui interviendraient dans ses caractères colloïdo-chimiques, une barrière sérieuse aux influences fermentatives. Les divers problèmes qui se présentent, quand on veut rechercher les causes de la force de résistance différente pour les différentes espèces d'amidon, ne peuvent, en aucune manière, être considérés comme résolus; cela résulte clairement de tout ce qui précède.

Admettons qu'il existe une couche externe différenciée, ce que rendent probable les observations cytologiques de Salter[2] comme aussi celles de Kraemer[3] et celles de Denniston[4];

[1] Beyerinck. De bouw der zetmeelkorrels. Versl. Wis-en Natuurk. afd. Kon. Akad. v. Wetensch. 1912; XX, 1252.

[2] Salter. Zur näheren Kenntnis der Stärkekörner. Jahrb. f. wiss Bot., 1898. XXXII, 117.

[3] Kraemer. Botan. Gazette, 1902, XXXIV, 341.

[4] Denniston. Trans. Wiscons. Acad. 1904, XV, 664 — La dernière est citée d'après l'ouvrage de Reichert.

nous ignorons absolument si cette membrane a une structure identique à celle des membranes situées vers l'intérieur des grains, et dont la projection se présente à nos yeux sous la forme de lignes circulaires. Il y a lieu encore de se demander, nous semble-t-il, si l'on peut attribuer à cette membrane externe une influence aussi prépondérante dans les phénomènes qu'on l'a fait constamment jusqu'ici; n'oublions pas, à ce point de vue, que nous ne savons rien quant à cette autre hypothèse possible: l'autre élément constitutif important des grains d'amidon, la β-amylose, ne pourrait-il pas se montrer plus apte à réagir dans un cas que dans l'autre?

Meyer et les chercheurs qui le suivent admettent, il est vrai, que cette dernière substance est identique à elle-même, dans toutes les espèces d'amidon; mais cette conclusion ne s'appuie que sur des essais faits sur des solutions d'amidon soumises à l'action de la chaleur. Tout nous fait prévoir, au contraire, que l'aptitude à réagir avec la diastase se trouve dans un rapport de dépendance étroite vis-à-vis de l'état colloïdal du substratum; précisément à ce point de vue, chimico-colloïdal, la transformation en empois, la «gélification» de l'amidon fait subir à ce dernier des modifications très importantes. Ces considérations doivent nous engager à ne pas accepter l'opinion de ces auteurs sans examen préalable sérieux.

Nous sommes donc amené ainsi à nous occuper, dans la présente étude, non seulement de la nature éventuelle de la couche externe et des lamelles, mais encore de la β-amylose de Meyer; et, comme cette dernière pourrait bien être la substance-mère de tous les autres constituants de l'amidon, nous allons l'examiner tout d'abord.

CHAPITRE I.

L'amidon naturel, non modifié.

§ 1. Aperçu général.

D'après la vieille théorie de Nägeli[1] l'amidon serait composé de deux substances; la première des deux, la granulose, est soluble dans l'eau bouillante et facilement attaquable par l'amylase; l'autre n'est pas soluble dans l'eau bouillante et résiste beaucoup mieux à l'amylase; comme cette substance offre certaines ressemblances avec la cellulose, Nägeli l'a appelée amylocellulose.

Meyer[2] a démontré plus tard que l'amylocellulose s'apparente de beaucoup plus près à la granulose que Nägeli ne l'avait pensé tout d'abord; si l'on chauffe, p. ex. l'amylocellulose à 120°, on peut la transformer en granulose. Cette parenté chimique des deux corps, que Meyer se représentait comme étant du même ordre que celle qui existe entre un anhydride et le corps dont il dérive, il l'exprima par les dénominations de α-amylose et de β-amylose, qu'il substitua resp. aux noms de l'amylocellulose et de la granulose.

Pendant un demi-siècle, nos connaissances relatives à la nature de l'amidon en restèrent à ce point. Une période de recherches actives s'ouvrit par les études de Maquenne[3] sur la rétrogradation des solutions d'amidon. Cet auteur attira

---

[1] Nägeli. Die Stärkekörner. Zürich 1858.

[2] Meyer. Untersuchungen über die Stärkekörner Jena 1895.

[3] Maquenne. Compt. rend. Acad. des Sc., 1902—1908.

l'attention sur ce fait, observé depuis longtemps, que les solutions d'amidon homogènes, conservées aseptiquement, laissent déposer, à la longue, un précipité granuleux; celui-ci offre une certaine ressemblance avec certaines espèces d'amidon à grains très fins, existant dans la nature. Il étudia l'influence exercée par les acides et par les alcalis sur ce phénomène. Les solutions d'amidon rétrogradé (dans l'eau surchauffée) donnent, avec l'iode, une coloration bleue plus intense que les solutions équivalentes d'amidon naturel; de plus, les solutions d'amidon obtenues par hydrolyse fermentative ne fournissent qu'environ 80 % de la quantité théorique de maltose; Maquenne en tira la conclusion qu'il doit y avoir encore une autre substance en présence, qu'il nomma amylopectine; exprimant ainsi, par ce nom même, qu'il considérait ce corps comme le support des propriétés visqueuses de l'empois, caractéristiques des solutions d'amidon naturel, mais qui manquent au contraire aux solutions d'amidon rétrogradé (dénommé aussi, parfois, artificiel).

Maquenne n'admet pas, néanmoins, trois éléments constitutifs dans l'amidon: il considère, en effet, l'α-amylose et la β-amylose comme identiques; toute la portion de l'amidon, qui n'est pas composée d'amylopectine, correspondrait, d'après lui, à l'α-amylose de Meyer; celle-ci pourrait, par certains processus spéciaux, être amenée à entrer en solution sous l'influence de l'amylopectine; elle se séparerait ensuite, peu à peu, de cette solution, en formant un précipité (= rétrogradation). Quant à la manière dont l'α-amylose se maintiendrait à l'état dissous, Maquenne ne s'explique pas très nettement. Il rappelle que l'inuline existe en solution dans le suc cellulaire, alors qu'après cristallisation elle devient insoluble; il croit, d'autre part, que les divers homologues de $C_6H_{10}O_5$ passent, par influence eutectique, dans la solution, dont l'amylose se séparerait, ultérieurement, par dilution, sous forme de cristaux.

Malgré les résultats de recherches ultérieures, qui affaiblis-

saient la valeur démonstrative de ses arguments, Maquenne est resté fidèle à ces interpétations; il admet encore aujourd'hui l'existence de l'amylopectine, cette substance, qui n'a, peut-être, que la signification d'une conception de l'esprit. Maquenne lui-même a démontré qu'en présence de diastase activée (c'est-à-dire, en veillant à ce que la concentration de H., dans la solution soit optimale), on peut obtenir un rendement de maltose qui est, à peu de chose près, un rendement théorique-Quant à la valeur de la réaction que donne l'iode, il y lieu de la discuter.

A quel endroit l'amylopectine se trouve-t-elle localisée à l'intérieur du grain d'amidon?

Maquenne a pensé tout d'abord que, conformément à ses fonctions, qui consistent à maintenir l'amylose à l'état dissous, l'amylopectine se trouvait distribuée, d'une façon homogène, à travers tout le grain. Plus tard, Madame Gatin-Gruzewska[1] indiqua une méthode de préparation, basée sur le gonflement qu'éprouvent les grains d'amidon sous l'influence d'une solution de soude (ou de potasse) très diluée; on acidifie ensuite, puis on lave. Ce traitement donne lieu à la formation de membranes ayant l'aspect de petits sacs, d'utricules, qui ont été décrits également par Beyerinck (l. c.); ces utricules sont, visiblement, originaires du pourtour des grains; Maquenne a modifié dès lors sa manière de voir dans ce sens.

La constitution de l'amylopectine, que les savants français avaient laissée absolument dans l'ombre, fut élucidée quelque peu par les travaux de Samec[2]; dans une série de recherches très développées cet auteur reprit l'étude de la rétrogradation et des conditions dans lesquelles elle se produit. Au cours de ces expériences, il opéra de très nombreuses déterminations de la viscosité, s'efforçant d'arriver ainsi à une conception plus nette de la structure des solutions colloïdales, et plus spécialement du

---

[1] Gatin-Gruzewska. Compt. rend., 1908, CXLVI, 540; 1911, CLII, 785.

[2] Samec. Studien über Pflanzenkolloide. Kolloidchem. Beihefte, 1911—1916.

degré d'hydratation de la phase disperse. Ses premiers travaux l'amenèrent à formuler cette conclusion que la rétrogradation constitue un cas spécial d'un phénomène très fréquent dans le groupe des lyocolloïdes: la floculation en solution pauvre en électrolytes. De la forme des courbes de viscosité au cours du vieillissement des solutions d'amidon, il conclut qu'en vieillissant celles-ci subissent une déshydratation énergique; de ce fait, la viscosité descend à $^1/_5$ de sa valeur primitive; et la déshydratation est même plus forte que la précipitation ne pourrait le faire prévoir.

Parallèlement à cette déshydratation physique, Samec admet encore une déshydratation chimique, aboutissant à la formation de substances analogues aux anhydrides et aux lactones.

Le rôle important qu'en dépit des quantités très minimes en présence (0,2—0,3%), jouent les électrolytes, se trouve ici tout naturellement porté à l'avant-plan; ce rôle leur avait déjà été reconnu précédemment, à la suite des recherches de Roux, Fernbach, Wolff et Fouard. De même que ces derniers, Samec remarque que l'on ne peut réaliser qu'une déminéralisation partielle par le lavage au moyen d'un acide dilué; il est impossible de se débarrasser de cette manière de la majeure partie de l'acide phosphorique. Il se figure ce dernier corps comme combiné chimiquement, entrant dans la formation d'un éther amylophosphorique; cette hypothèse n'est, au surplus, pas neuve. Mais l'auteur qui nous occupe a pris la peine d'en vérifier minutieusement la valeur pour l'explication de toutes les particularités des solutions d'amidon, qui ont été observées jusqu'à présent: la rétrogradation, par exemple, ainsi que l'influence des acides et des bases sur la viscosité et la conductibilité électrique de ces solutions. Samec en conclut finalement que c'est cet éther qui serait le support des propriétés visqueuses que présentent les solutions fraiches, et qu'il doit, conséquemment, être identifié avec l'amylopectine de Maquenne.

En admettant, pour le poids moléculaire de l'amylose, le chiffre de 10000, qui n'est certainement pas trop élevé, mais probable-

ment trop bas, on trouve que l'amidon de pomme de terre contiendrait environ 20% d'amylopectine.

Une solution d'amidon, dès qu'elle a vieilli, ne peut plus être ramenée, d'après Samec, au degré de viscosité élevé primitif, même si tous les constituants y existent encore. Samec explique cette irréversibilité de la rétrogradation par cette hypothèse: au sein de l'eau, l'éther se dissocierait, avec formation d'amylose difficilement soluble; le phénomène d'éthérification, d'autre part, ne serait pas réversible.

Je ne veux pas discuter ici la question de savoir comment on peut faire marcher de pair cette dissociation extraordinairement facile et la grande stabilité des éthers que Northrop et Nelson[1] sont parvenus à isoler réellement. S'il était prouvé que l'éther, qui n'est pas dissocié dans l'acide chlorhydrique concentré, reste stable également dans l'eau froide ou chaude, la dernière explication de la rétrogradation donnée par Samec tomberait. Par contre, l'existence de l'acide amylophosphorique (= amylopectine) se trouve désormais établie assez solidement.

Fouard[2] aboutit à une conclusion différente, relativement à l'homogénéité de l'amidon. Cet auteur a appliqué aux solutions d'amidon la méthode de la filtration à travers des membranes de collodion, découverte récemment; les solutions d'amidon qu'il utilisa avaient été déminéralisées préalablement, d'après le procédé de Fernbach et Wolff, en les traitant de façon extrêmement prudente par un acide étendu; les solutions ainsi traitées furent les seules qu'on parvint à faire passer au travers des membranes de collodion.

C'est à la suite de ces recherches que Fouard se crut autorisé a formuler cette conclusion: „L'amidon est une substance chimique unique susceptible d'une transformation totale et réversible vers un état de solution parfaite"[3].

[1] Northrop & Nelson. Journ. Amer. Chem. Soc., 1916, XXXVIII, 472.

[2] Fouard. Recherches sur l'état colloïdal de l'amidon, et sur sa constitution physico-chimique. Thèse. Paris 1911.

[3] l. c. p. 63.

Fouard considérait cette solution comme une solution „véritable“, conformément d'ailleurs à l'opinion courante à cette époque, et qui remontait à Duclaux, d'après laquelle les membranes de collodion ne sont perméables que pour les solutions des cristalloïdes. Et, en réalité, la dispersité de la phase solide était ici extrêmement grande, comme le démontrèrent les observations ultramicroscopiques, qui ne purent déceler la présence d'aucune particule.

Nous ne pouvons, malgré cela, regarder la conclusion de Fouard que comme au moins prématurée. On ne peut nier que l'amidon utilisé par lui n'ait été modifié par le traitement à l'acide; on remarquera, de plus, que le fait que la substance dissoute a traversé, toute entière, un ultrafiltre ne constitue pas à strictement parler un argument en faveur de son homogénéité chimique. Les ultrafiltres sont, en effet, des cribles dont les mailles présentent une largeur déterminée: des molécules de constitution chimique différente peuvent donc passer sans difficulté à travers ces mailles, pourvu que leur volume soit le même.

Il nous reste encore à mentionner, parmi les ouvrages qui rentrent dans le cadre de notre mémoire, les recherches de Fernbach et Wolff[1] sur l'action coagulatrice qu'exercent les solutions d'amylose sur l'amidon dissous; cette réaction est traitée in extenso par ces deux auteurs qui l'attribuent à la présence d'un enzyme spécial, l'amylocoagulase; celle-ci existerait, dans les cellules végétales, surtout pendant la période de synthèse de l'amidon; on peut aussi, par certains procédés, en démontrer la présence dans l'extrait de malt. L'existence de cet enzyme spécial a, néanmoins, été mise en doute à plusieurs reprises. Fouard considérait la réaction en question comme une réaction amylolytique à rebours, c'est-à-dire comme une zymosynthèse opérée par la diastase; à mon avis, il y a lieu de croire plutôt que ce sont des phénomènes d'adsorption qui entrent en jeu, phénomènes qui précèdent régulièrement toute décomposition fermentative;

[1] Fernbach et Wolff. Compt. rend., 1903—1904.

cette décomposition toutefois peut, dans certaines conditions déterminées, ne pas se produire. Quoi qu'il en soit, le phénomène semble intéressant, au point de vue de la genèse des grains d'amidon, tels qu'ils se présentent dans la nature.

Tirons donc, pour finir, les conclusions de l'aperçu général qui précède. Quiconque voudra étudier les conditions qui déterminent la production et la forme des différents éléments constitutifs de l'amidon, devra tenir compte, désormais, de la rétrogradation, de l'existence de l'acide phosphorique en combinaison organique, de l'action coagulatrice des enzymes et, „last not least", du rôle des électrolytes.

§ 2. Méthode.

Vu le caractère labile du complexe naturel „amidon", j'ai estimé qu'il fallait l'étudier dans des conditions qui se rapprocheraient le plus possible de celles dans lesquelles il se rencontre dans la nature. La transformation en empois, la „gélification" de l'amidon constitue déjà en soi — je le montrerai plus loin — une intervention violente dans ce système; c'est pourquoi je me suis décidé à opérer sur des solutions d'amidon préparées à froid.

Les grains d'amidon intacts peuvent rester pendant des mois dans le dialyseur, sans que la pellicule externe laisse passer la moindre parcelle d'amylose. Dès qu'on entame cette pellicule, par exemple en triturant les grains avec un peu d'eau, on voit la masse fluide devenir peu à peu visqueuse; si on dilue alors le liquide et qu'on le filtre ensuite, le filtrat donne une réaction bleu foncé avec l'iode. Le fait est connu depuis longtemps; vers 1860, il a été l'objet de longues discussions; certains auteurs avaient émis l'avis que la chaleur dégagée par la trituration aurait suffi pour transformer l'amidon en empois; mais, si l'on prend la précaution de refroidir fortement le mortier, on obtient encore le même résultat. Il est, du reste, facile de se convaincre que, lorsqu'on écrase des grains d'amidon entre le porte-objet et le

verre couvreur du microscope, les grains qui ont été sérieusement entamés sont entourés d'un liquide granuleux, qui, visiblement, s'écoule par les brêches de la paroi.

Lorsque, pour arriver à étudier systématiquement la substance soluble, on veut trituter ainsi les grains d'amidon à plusieurs reprises, et pousser cette opération aussi loin que possible, on est frappé par la grande résistance qu'opposent ces grains; ceux-ci résistent même, en grande partie, à une trituration prolongée dans un mortier. Il n'est pas recommendable de mélanger du sable quartzeux ou de la poussière de verre à l'amidon, car ces substances constituent des obstacles à la filtration.

Le procédé qui nous a donné le meilleur résultat, ce fut la trituration sur une plaque de verre mate, au moyen d'une molette de verre. Cette dernière était représentée par un flacon de verre, dont le fond avait été si exactement aplani par le polissage que l'on observait des phénomènes d'adhésion énergique sur la plaque de verre sèche. Nous remplissions le flacon de mercure, par dessus lequel on fixait un solide tampon d'ouate.

Même par ces procédés, la trituration de l'amidon reste toujours une besogne très laborieuse. Pour arriver à triturer convenablement quelques grammes, des heures se passent avant de pouvoir constater, à l'examen microscopique, que les grains sont complètement écrasés, ou tout au moins qu'ils ont perdu ce fort pouvoir réfringent qui s'observe facilement sous le microscope. Ce dernier caractère — qui dépend probablement, en partie tout au moins, de la forme lenticulaire des grains d'amidon — permet à l'opérateur de juger, par un simple coup d'œil, de l'avancement de son travail. La trituration de l'amidon, que l'on aura soin d'humecter constamment, devra être poursuivie jusqu'à ce que le mélange ait perdu son aspect brillant, et soit devenu mat à la vue.

Il est permis d'admettre, provisoirement, que la vitesse avec laquelle le ferment amylolytique est capable d'opérer l'hydrolyse se trouve sous la dépendance stricte de la grosseur des molates que renferme la pseudo-solution. Une telle hypothèse nous semble

probable à priori; une observation dûe à Fouard lui apporte, de plus, une certaine confirmation: cet auteur nota, en passant, qu'une quantité donnée de matière, présente dans une solution d'amidon déminéralisé, qu'il avait préparée, était transformée bien plus rapidement par les acides dilués que la même quantité de matière contenue dans une pseudo-solution de concentration identique.

Il s'ensuit que si l'on veut vérifier l'hypothèse que nous avons émise dans notre introduction, on devra examiner les solutions d'amidon, préparées à froid, au point de vue de leur degré de dispersité; il s'agissait, on s'en souviendra, de décider si le composant des grains d'amidon qui est soluble dans l'eau a une influence sur la vitesse de digestion de l'amidon cru. Un procédé qui semble se prêter à une telle démonstration consiste à essayer la filtration à travers des milieux inégalement perméables. On peut tout d'abord employer des filtres de papier, pour aboutir, en fin de compte, aux ultrafiltres dont on pourra reproduire à volonté des exemplaires à pores présentant la largeur déterminée. Ce sont surtout les filtres de collodion qui remplissent le mieux, à mon avis, les conditions requises, parce qu'ils ne réagissent pas chimiquement avec l'amylose, et qu'ils ne l'absorbent pas.

Les résultats obtenus jusqu'à présent, par le seul expérimentateur en ce domaine, ne semblaient pas très encourageants pour les expériences que nous avions projetées au moyen d'ultrafiltres. Fouard, mentionné déjà précédemment à plusieurs reprises, qui a étudié la manière dont se comportent les solutions d'amylose en présence des membranes semiperméables, ne put utiliser des ultrafiltres que dans le cas d'amidon déminéralisé. On constatera plus loin que nos craintes n'étaient pas fondées.

§ 3. Préparation des membranes semi-perméables de collodion.

Il y a grand intérêt, pour les recherches comparatives que nous voulons exécuter, à pouvoir préparer rapidement et facilement des filtres ayant toujours des pores de même diamètre; c'est pourquoi

nous voulons donner ici quelques détails sur la façon dont nous avons procédé.

Fouard utilisait les filtres tubulaires, fermés inférieurement, que l'on peut fabriquer d'après des méthodes différentes; celle qui est indiquée par Delezenne est la plus commode. On en trouvera la description dans la troisième partie du Manuel des opérations biochimiques par Abderhalden[1]. La largeur des pores est réglée, dans ce genre de filtres, par la composition de la solution de collodion. Au cours des dernières années, il a paru plusieurs articles relativement à ces filtres[2] et des modifications ont été proposées quant à leur mode de préparation; certaines de ces modifications permettent un réglage précis du diamètre des pores. Tous les procédés indiqués pèchent cependant en un point, c'est que les filtres présentent une épaisseur irrégulière, ce qui les rend moins exacts et aussi moins maniables. Pour préparer convenablement ces filtres, il faut avoir déjà une grande pratique; aussi ces filtres se trouvent-ils, actuellement, tout préparés dans le commerce, en Amérique. D'autre part, les services que ces derniers peuvent rendre sont très relatifs, puisqu'ils ne donnent aucune garantie quant à la constance du diamètre des pores, et que celle-ci est difficile à contrôler.

Au cours de la préparation des très nombreux filtres que nous avons eu à utiliser pour nos recherches, nous nous sommes efforcé de tourner les difficultés; nous y sommes parvenu de la manière suivante, qui nous donna d'excellents résultats, et que nous avons toujours suivie depuis lors.

Dans le couvercle, peu profond, de boîtes de Petri pas trop petites, on verse du mercure, jusqu'à ce que le fond soit recouvert complètement. C'est sur cette surface propre et exactement horizontale que l'on verse ensuite la solution de collodion, en un jet mince, au centre de la boîte: le liquide s'écoule alors uniformément et régulièrement vers le pourtour. Il est facile d'aper-

[1] Handbuch der biochemischen Arbeitsmethoden.

[2] Walpole. Biochem. Journ. 1915, IX, 285. Brown. Ibid. 1915, IX, 591 et 1917, XI, 40. Kober, J. Amer. Chem. Soc., 1918, XL, 1226.

cevoir, sur la surface fortement miroitante du mercure, jusqu'à la moindre bulle d'air, de façon à pouvoir s'en débarrasser immédiatement. On continue à verser le collodion jusqu'à ce que le liquide atteigne les bords du verre, et on mesure le volume correspondant. On obtient de cette manière des filtres ayant toujours la même surface, et comportant exactement la même quantité de matière; ils ont de plus l'avantage de présenter partout la même épaisseur; ils possèdent un bord suffisamment résistant, qui les empêche de se déchirer pendant les manipulations: ce bord est formé, en effet, par le collodion qui s'accumula dans l'espace qui reste libre entre le verre et la surface du mercure, déprimé, comme on sait, sous l'influence des forces capillaires.

Pour les boîtes de Petri de 15 centimètres de diamètre nous avons utilisé 15 centim. cubes de collodion, en mélangeant 10 volumes de collodion Edit. IV de la Pharmacopée néerlandaise à 15 volumes d'alcool fort. Lorsqu'on a rempli les boîtes, de la manière indiquée, on les abandonne à elles-mêmes dans un calme complet pendant quelques instants; il faudra avoir bien soin que la température soit la même pour tous les filtres, et qu'on laisse reposer après cela toutes les boîtes exactement pendant le même temps, p. ex. pendant 10 minutes. Si on laisse le collodion sécher plus longtemps, le filtre sera plus difficilement perméable; si, par exemple, on avait laissé sécher le collodion pendant une demi-heure, le filtre, une fois en action, ne possèderait plus qu'une vitesse de filtration, pour l'eau pure, équivalant à environ les $^2/_3$ de la vitesse des filtres qui ont séché pendant moins longtemps.

Après 10 minutes d'exposition à la température ordinaire, l'odeur d'éther persiste encore, mais la pellicule a déjà une solidité suffisante pour supporter de l'eau distillée, qu'on y verse, sans se plisser. Cette quantité d'eau est mesurée également, et on la maintient constante. Lorsque les courants de diffusion assez forts que l'on voit se produire à la surface du collodion ont cessé, on détache avec précaution les bords de la pellicule de la

paroi du verre au moyen d'une petite spatule de corne, en imprimant à celle-ci un mouvement vertical vers le bas; on pousse ensuite la spatule à une certaine distance sous la membrane, et on détache enfin, par un mouvement circulaire de glissement, le pourtour du filtre du mercure. Il est très facile, alors, d'enlever le filtre, que l'on lave ensuite à l'eau distillée, et que l'on met en réserve.

Avant de se servir d'un de ces filtres, on dépose la pellicule de collodion sur un ballon de verre renversé et humecté, en disposant les plis d'une façon convenable. Quand on replace le ballon dans sa position normale, le filtre y reste adhérent et peut être introduit dans un entonnoir; on peut, au besoin, empêcher le filtre de descendre trop profondément dans l'entonnoir, en plaçant sous le filtre une petite plaque de porcelaine perforée, de grandeur convenable. Pendant la filtration, il faut protéger les bords du filtre contre la dessiccation, en recouvrant l'entonnoir d'un couvercle de verre bien ajusté.

§ 4. Matériel expérimental.

Lorsqu'on parcourt la liste des travaux qui ont été publiés relativement à la nature de l'amidon, au cours de ces dernières années, par les auteurs tels que Maquenne, Fouard, Samec, on est frappé tout de suite par ce fait que tous les expérimentateurs ont utilisé, comme objet de leurs recherches, une seule et même espèce d'amidon: l'amidon de pomme de terre. Cette circonstance est pour nous en même temps un avantage. L'avantage consiste en ce que nous pouvons actuellement comparer directement entre eux les résultats de toutes ces recherches; celles-ci ont, d'autre part, le désavantage de ne nous donner qu'un aperçu unilatéral du problème de l'amidon.

Il entrait précisément dans le plan de cette étude d'utiliser plusieurs espèces d'amidon; des raisons pratiques nous obligeaient, d'autre part, à en limiter le nombre, et de faire conséquemment un choix parmi elles.

Quiconque consultera les données que nous possédons actuellement sur la digestibilité des grains d'amidon cru par l'amylase — et que nous avons énumérées dans notre introduction — remarquera qu'il existe un rapport, peut-être fortuit, entre la digestibilité et la présence de couches parallèles nettement marquées. Nous avons estimé, pour notre part, qu'il y avait intérêt, en choisissant les diverses espèces d'amidon à étudier, de tenir compte de cette remarque; on pouvait espérer arriver, de cette manière, à se faire une idée plus claire de la nature et de la raison d'être de cette structure en couches concentriques, au sujet de laquelle on a tant écrit, et que l'on connaît si imparfaitement.

Les mémoires étendus de Nägeli et de Reichert — ce dernier illustré de centaines de microphotographies — s'occupent, entre autres sujets, de la morphologie des grains, et furent pour nous des guides utiles dans la recherche des objets les plus convenables.

Parmi les genres végétaux dont l'amidon présente cette structure stratifiée d'une façon très nette, il faut remarquer surtout *Diefenbachia*, *Lachenalia*, *Musa*, *Hedychium*, *Canna*, *Gloxinia*, *Phaius* et *Solanum tuberosum*. Aucun de ces amidons n'est plus joliment stratifié que celui des *Canna*, qui est, de plus, très facile à trouver; c'est pourquoi nous l'avons choisi, avec l'amidon de la pomme de terre, comme type de ce groupe.

A côté de ces amidons, il en est beaucoup d'autres espèces chez lesquelles les couches parallèles des grains sont à peine visibles. Parmi les plus connus, citons l'amidon de froment, de seigle, d'orge, de châtaigne, de chêne, de tulipe, d'*Ipomoea*, de *Krameria*, d'*Althaea* et celui de *Symphytum tuberosum*. Comme types de ce groupe, nous avons choisi l'amidon du froment et celui de la tulipe, qui, dans les circonstances actuelles, nous étaient le plus facilement accessibles.

Nous avons préparé nous même l'amidon que nous voulions examiner, en partant des organes végétaux, soigneusement nettoyés préalablement. Comme l'amidon absorbe avidement les sels, et que ceux-ci influent ensuite sur les propriétés de l'amidon,

qu'ils modifient, il fallait éviter d'employer l'eau de la canalisation. Il importait également de faire en sorte que, pendant la trituration des organes souterrains, le suc cellulaire qui s'en écoule ait le moins d'occasion possible d'agir sur l'amidon; nous y avons paré en exécutant le râpage de ces organes en présence d'une grande quantité d'eau distillée; celle-ci était renouvelée constamment. Un tamisage débarrassait l'amidon des restes des parois cellulaires, après quoi nous le faisions encore passer, par frottement, à travers des linges préalablement bouillis dans l'eau distillée; puis il était, enfin, purifié une dernière fois par décantation.

L'amidon de froment subissait les mêmes préparations; nous l'obtenions par mouture de froment soigneusement trié et séparation du son par tamisage; nous le pétrissions ensuite, en présence d'eau, afin de réunir tout le gluten en un bloc; la pâte ainsi obtenue, enfermée dans un linge fin, était soumise à un battage et retravaillée à nouveau, plus doucement, dans un courant d'eau distillée, jusqu'à séparation à peu près complète du gluten et de l'amidon. Une décantation assurait, finalement, la purification complète de notre amidon.

L'amidon humide fut séché à l'air, sous l'influence d'une chaleur très douce, puis conservé à l'air sec.

§ 5. Degré de dispersité des éléments extraits par l'eau froide.

L'amidon fut frotté en présence d'eau froide, ainsi que nous l'avons exposé plus haut. Le liquide trouble fut alors additionné d'eau, jusqu'à ce que la concentration, rapportée au poids sec de la substance primitive, représentât 5 pourcent du total. Au sein de ce liquide, il se forme assez rapidement un dépôt composé des fragments de grains de la pellicule externe et des lamelles, ainsi que des grains endommagés, présentant des déchirures, et dont à cause de celà le contenu à été entrainé.

Au dessus de ce précipité, on observe un liquide opaque, d'un

blanc laiteux; qui visiblement, forme avec les matières en suspension une solution colloïdale; ni la centrifugation énergique, ni la filtration par le papier à filtrer ne modifient cet aspect, qui rappelle celui d'une solution d'amidon rétrogradée. La concentration d'une certaine solution d'amidon de tulipe de ce genre, traitée comme il vient d'être dit, centrifugée et filtrée se chiffrait par 1,04 pourcent.

Cette solution, dans les divers cas étudiés par nous, fut versée sur les ultrafiltres de collodion. La quantité de matière contenue dans l'ultrafiltrat, fut déterminée par évaporation de 10 centim. cub., dessiccation jusqu'à poids constant, et pesée du résidu.

Espèce d'amidon		Teneur en amylose des solutions filtrées sur membranes de collodion
Amidon	de pomme de terre	0,07 pour cent
„	canna	0,21 „ „
„	tulipe	0,30 „ „
„	froment	0,50 „ „

Ces résultats furent confirmés à plusieurs reprises: la concentration, à part quelques très légères déviations, a toujours oscillé autour de ces moyennes.

On peut déduire de ces chiffres que cette conclusion tirée par Fouard est certainement erronée: „L'amidon naturel est totalement insoluble dans l'eau, l'action croissante de la chaleur l'hydrolyse lentement et son faible coefficient de solubilité est dû alors à une trace d'amidon hydrolysé qui ne préexistait pas dans l'amidon naturel"[1]. Fouard indique, à un autre endroit, la grandeur de ce coefficient de faible solubilité des solutions d'amidon surchauffées (à 120°), et affirme que ce chiffre s'élève à 0,04 pour cent. S'il n'a pas observé la solubilité plus grande de l'amidon de pomme de terre trituré à froid, c'est probablement parce que la trituration était imparfaite.

Chacun aura remarqué sans doute, que la série représentée plus haut, dans laquelle les amidons sont classés dans l'ordre des

[1] Fouard. Recherche sur l'état colloïdal de l'amidon . . . . . p. 38.

grandeurs croissantes de la phase fortement disperse, est absolument identique à la classification que l'on pourrait faire en les disposant dans l'ordre des valeurs croissantes de la digestibilité par les amylases; il y a même, entre les différents coefficients un rapport déterminé, de sorte que l'on peut dire p. ex. que l'amidon de froment, qui contient 10 fois plus de matière susceptible de traverser l'ultrafiltre que celui de la pomme de terre, est décomposé environ 10 fois plus vite par les ferments amylolytiques. Il serait prématuré, néanmoins, de vouloir attribuer à ce seul facteur les différences qui se manifestent entres les divers amidons, au point de vue de l'action exercée par les amylases sur les grains d'amidon crus. Ce facteur a cependant son importance: c'est ce que montreront les observations suivantes.

Nous avons procédé à la comparaison de deux solutions d'amidon de froment; la première avait filtré au travers de la membrane de collodion et était diluée, après l'analyse, jusqu'à une teneur de 0,3 pour cent; l'autre solution, du même amidon et à la même concentration, avait été préparée par ébullition. Des quantités identiques des deux solutions furent mélangées, à 15°, avec des quantités, exactement mesurées à la pipette, d'une solution très diluée d'amylase; la nature des réactions qui s'étaient produites fut alors déterminée au moyen de la réaction à l'iode.

La première des deux solutions (l'ultra-filtrat) donna, après 12 minutes, la réaction de l'érythrodextrine pure, et après 15 minutes la coloration brune, peu visible, qui caractérise l'achrodextrine. Quant à la solution préparée à chaud, elle donna, après 35 minutes, seulement une légère coloration violette, dont l'intensité n'avait pas encore diminué après 20 minutes. Nous avons estimé qu'il n'était pas utile de prolonger plus longtemps l'observation, les résultats obtenus étant suffisamment démonstratifs, surtout si l'on veut considérer que l'activité de la faible solution du ferment peut très bien avoir diminué pendant ce laps de temps; c'est ce que nous ne pouvons savoir exactement.

Il est probable, en tout état de cause, que les composants à

grande dispersité sont décomposés avec une rapidité certainement 75 fois plus grande que les autres.

On doit admettre que l'amidon du froment contient au moins 10 pourcent d'une substance de grande dispersité et rapidement digestible; on ne peut néanmoins baser sur ce seul fait une explication des différences importantes qui existent entre la digestibilité des divers amidons; une objection se présenterait, en effet, immédiatement: c'est qu'il n'y a plus trace de ces différences, quand on examine les solutions préparées à chaud. A plusieurs reprises des savants ont cherché à établir l'existence de ces différences guidés par des considérations médicales. Si elles existent vraiment, elles doivent être bien peu importantes[1]), et n'ont rien de commun avec celles dont nous venons de parler; dans les recherches comparatives, on a observé précisément que ce sont les solutions d'amidon de pomme de terre qui sont le plus facilement attaquables, un peu plus faiblement même que celles de l'amidon de froment. On peut attribuer cette uniformité à la disparition de la pellicule externe, qui éclate lors de la „gélification", ou du moins devient poreuse à la suite de la grande augmentation de volume que subissent les grains; dans tous les cas, et pour tous les amidons, le ferment se trouvait, dès lors, toujours en présence de la β-amylose, partout identique. Comme il résulte, cependant, de ce qui précède, que l'amylose est de nature différente dans les divers amidons, il était très intéressant de rechercher sous quelles formes elle se présente dans les empois.

§ 6. Recherche de la dispersité des solutions d'amidon bouillies.

Nous avons préparé nos solutions de la manière suivante: 1 gramme d'amidon fut délayé dans quelques centim. cubes d'eau distillée, et ce mélange versé ensuite dans 80 cent. cub. d'eau

[1]) Pauletig. Zeitschr. f. physiol. Chem., 1917, C, 74. — Le lecteur trouvera dans Reichert (l. c.) un exposé de la bibliographie ancienne, qui est très considérable.

distillée bouillante; on ajoute de nouveau de l'eau et on fait bouillir encore une fois; après refroidissement, on additionne d'eau distillée jusqu'à parfaire 100 centim. cub.

La différence de nature de l'enveloppe externe et des lamelles, qui existent entre les divers amidons, apparaît très nettement à la suite de cette opération. L'amidon de tulipe donne une solution absolument homogène, à peine opalescente, tandis que pour l'amidon de froment la solution, tout en étant encore homogène, constitue un liquide laiteux et opalescent. Les portions les plus résistantes des grains ont donc encore le pouvoir de disperger au sein du liquide, quand on fait bouillir celui-ci, mais à un degré moindre; les molates restent plus volumineux et possèdent un pouvoir d'hydratation moindre.

Chez Canna comme chez la pomme de terre, la pellicule externe est plus stable. Après l'ébullition on peut retrouver dans le liquide les grains, qui ont gonflé énormément; Beyerinck a observé que le diamètre des grains a augmenté à peu près dans la proportion de 1 à 3,5. Ces données permettent de calculer que, dans une solution à 1%, les grains arrivent exactement à se toucher. Il est probable que dans ces conditions les utricules retiennent, par capillarité, l'eau qui les baigne; c'est tout au moins un fait d'observation que la solution d'amidon de pomme de terre à 1% abandonne très peu d'eau à l'ultrafiltre et que la solution à 2% n'en laisse plus échapper une goutte, même après un repos de plusieurs jours. Pour ces raisons, nous avons procédé, pour ces amidons, à la transformation en empois, en les chauffant dans une capsule placée au bain-marie, en présence d'un volume d'eau décuple; la masse résistante fut ensuite broyée pendant quelque temps dans la capsule; on l'amène, enfin, par addition d'eau bouillante, au volume requis. Ce traitement montre bien qu'au sein de l'eau bouillante les utricules doivent se trouver dans un état instable. Après la trituration, on n'en découvre plus, en effet, aucune trace; ils sont manifestement "dispergés" dans le liquide: celui-ci est, désormais, aussi transparent qu'une solution d'amidon de tulipe. Les

solutions furent ensuite filtrées sur les ultrafiltres de collodion.

Solution d'amidon préparée à chaud; 1:100	Teneur en amylose des solutions filtrées sur les membranes de collodion
Amidon de pomme de terre	0,04 pour cent
„ „ Canna	0,04 „ „
„ „ tulipe	0,06 „ „
„ „ froment	0,04 „ „

Les chiffres qui figurent dans ce tableau constituent des moyennes résultant de plusieurs analyses. Le coefficient correspondant au froment, par exemple, qui diffère tant du coefficient de solubilité de l'amidon trituré à froid, est le résultat moyen de 5 analyses, effectuées à des moments différents, au moyen de filtres renouvelés à chaque fois; les autres exemplaires de ces filtres, préparés en même temps, laissaient passer des quantités relativement fortes des extraits d'amidon triturés à froid, en donnant, chaque fois, des résultats qui oscillaient entre 0,03 et 0,05%.

On voit donc que les micelles, qui étaient capables à froid de traverser les ultrafiltres, ont perdu, après ébullition, le pouvoir de passer au travers des membranes de collodion. Les raisons de cette modification peuvent être recherchées soit dans une flocculation soit dans une augmentation de volume des molates, provoquée par une hydratation plus forte; une chose est certaine, nous le constaterons plus loin, c'est que la cause de ces phénomènes est de nature complexe.

Les observations qui précèdent ont dans tous les cas établi ce fait, que l'ébullition fait subir à l'amidon une modification, qui le prive de ses composants les plus «disperses» et capables de traverser les ultrafiltres. Il est permis de voir dans cette modification la cause de la façon de réagir des solutions d'amidon à l'égard des enzymes diastasiques, dont nous avons donné plus haut des exemples.

§ 7. Influence de la gélification sur le degré de «dispersité».

De ce qui a été exposé au paragraphe précédent il ressort que l'on doit ajouter, aux variations qui accompagnent la gélification de l'amidon, ce phénomène nouveau: la modification qu'éprouvent, sous l'action de la chaleur, les composants de forte dispersité. Il semble tout naturel d'admettre que l'amylose subit, dans ces conditions, une diminution de son degré de dispersité, analogue à celle que présentent d'autres solutions colloïdales quand on les chauffe. Ainsi l'iode, dont la dispersité est relativement élevée à froid, voit sa dispersité diminuer si on le chauffe; on peut s'en rendre compte en soumettant à l'action de la chaleur une solution d'iodo-érythrodextrine: de rouge, la coloration passe au bleu; la même chose a lieu pour une solution d'amylose colorée en rouge par addition d'iode et d'un surplus d'iodure de potassium.

Dans tous ces cas, on voit la couleur primitive, partant le degré de dispersité du début, réapparaître rapidement par le refroidissement. De toutes les expériences de filtration que nous avons mentionnées — qui ont été effectuées toujours assez longtemps après le refroidissement et qui s'étendent sur une période de temps assez longue — il résulte que l'amylose ne se comporte pas de la même manière. Cependant, même dans le cas de l'amylose, la réaction est réversible, quoique très lente; les chiffres qui suivent le montrent.

Après avoir examiné des peudosolutions, préalablement soumises à l'ébullition, de ces amidons qui contiennent une grande proportion de substances capables de traverser l'ultrafiltre, nous les stérilisons, puis nous les abandonnons à elles même dans l'obscurité; 50 jours plus tard nous les réexaminons et nous trouvons les résultats suivants

	Quantité d'amylose dans l'ultrafiltrat 24 h. après préparation	50 jours après
Amidon de froment	0,04%	0,4%
„ „ tulipe	0,06%	0,3%

Des phénomènes réversibles, qui se présentent au cours de la gélification de l'amidon, ont été décrits par Katz, dans ses études quantitatives sur l'imbibition; celles-ci l'amenèrent à conclure que la gélification est un phénomène réversible, régi par la loi chimique dite action de masse, et basée sur un commencement d'hydrolyse[1]. On peut se demander si cette hydrolyse peut être considérée comme la cause du phénomène qui nous occupe. Par la nature même des choses, l'hydrolyse doit en effet amener une diminution de volume des molécules, — ce qui n'exclut nullement, d'ailleurs, un agrandissement des molates. Notre réponse sera négative, car, nous le verrons plus loin, les substances qui peuvent traverser l'ultrafiltre n'interviennent en aucune manière dans le phénomène de la gélification proprement dite.

Pour démontrer cette proposition nous avons agité de l'amidon de froment pendant quelques heures avec 8 fois son volume d'eau, dans un thermostat réglé à 65°. Cette température marque, pour l'amidon en question, le début de ce que l'on appelle la seconde gélification: l'amidon devient translucide, sans que la courbe d'imbibition modifie sa direction. La brisure de la courbe est située, pour cet amidon, à 57,05 et correspond à la première gélification. A la fin de l'opération, l'amidon avait fortement gonflé et avait un aspect vitreux; les parois sont, de plus, devenues perméables pour l'amylose. Les températures plus élevées ne modifient en rien la nature des phénomènes. L'amidon continue simplement à gonfler un peu plus, mais très régulièrement, et les grains se désagrègent peu à peu. Après refroidissement le liquide fut allongé jusqu'à concentration de 5%, et la solution d'amylose ainsi obtenue examinée au point de vue de sa dispersité.

La proportion d'ultrafiltrat s'élevait à 0,3%. Remarquons que la concentration de la solution d'amylose, grâce à la diffusion,

[1] Katz. Is de verstijfseling een evenwichtsproces dat door de massawerkingswet beheerscht wordt? Versl. Kon. Akad. v. Wet. Afd. Wis- en Natuurkunde. 1915, XXIII, 1150.

doit s'égaliser de part et d'autre de la membrane; or, il s'agit là d'un processus qui exige un temps assez long pour s'effectuer; il s'ensuit que la modification provoquée par l'ébullition, et dont nous parlions plus haut, n'a pas encore eu le temps de se produire, au moment où la gélification est déjà un fait accompli.

Il est certain, d'autre part, que la perte de la capacité à traverser le filtre que provoque l'ébullition, n'est pas un phénomène qui soit comparable — à tous les points de vue — avec les exemples mentionnés plus haut; on peut le démontrer en faisant bouillir une solution d'amylose obtenue par ultrafiltration et en la soumettant ensuite à une seconde ultrafiltration; on constate alors que la concentration a très peu diminué. Nous avons fait bouillir — pendant aussi longtemps que nous l'avions fait pour les solutions d'amidon de froment du § 6 — une solution d'amylose de froment à 0,4 %, obtenue par filtration au travers des membranes de collodion. Si la concentration de la solution était, dans ce dernier cas, de 0,04 %, celle de la solution d'amylose de dispersité très élevée correspondait, après ébullition, à 0,3 %.

Ce fait est difficile à expliquer. Ou pouvait supposer que, dans les solutions qui n'avaient pas filtré à travers le collodion, le calcium exerce une influence sur la variation de la grandeur des molates d'amylose (voy. Chap. III); c'est pourquoi nous avons fait bouillir, en présence de faibles quantités d'hydroxyde calcique, des solutions d'amylose de froment de dispersité élevée, et de concentration égale à 0,3 %; nous les avons ensuite filtrées de nouveau sur l'ultrafiltre. Nous avions ajouté à 15 centim. cub. de l'ultrafiltrat, respectivement 0,1 c. c. et 0,5 c. c. d'une solution $^{1}/_{20}$ normale de $Ca(OH)_2$. Dans les deux cas la concentration de l'ultrafiltrat, après ébullition, s'éleva à 0,25 %; il n'est donc pas probable que les ions de Ca puissent jouer un rôle prépondérant dans ces phénomènes.

Nous nous sommes demandé enfin, si, à côté des réactions chimico-colloïdales il n'y avait pas place pour des processus chimiques proprement dits; sous l'action de la chaleur, l'amylose «disperse» ne pourrait-elle pas, par exemple, former des éthers,

en se combinant avec les acides amylophosphoriques non neutralisés? Pour vérifier l'exactitude de cette hypothèse, nous avons fait bouillir une solution à 0,3 °/₀ d'amylose de dispersité élevée, avec la quantité voulue, calculée d'avance, de KH_2PO_4. La concentration de l'ultrafiltrat ainsi obtenu ne différait que de façon insignifiante de la concentration du début; il faut donc conclure que, ou bien il ne se forme pas d'éthers de ce genre, ou bien que ceux-ci n'exercent aucune influence sur la filtrabilité par l'ultrafiltre; le facteur que nous avions envisagé tombe donc, pour autant, toutefois, que l'éther mixte de potassium soit identique avec l'éther neutre formé par l'amylose.

Les pages qui précèdent auront montré, dans tous les cas, que la recherche d'une explication plausible de la variation de la dispersité sous l'influence de l'ébullition n'est pas un problème si simple. Peut-être des phénomènes d'adsorption interviennent-ils; mais leur rôle ne pourrait être que d'ordre exclusivement mécanique et ils devraient présenter un coefficient calorique élevé.

---

§ 8. Conclusion.

Les expériences relatées dans les pages précédentes montrent que, contrairement à ce que l'on croyait jusqu'à présent, le plastide vivant est capable de secréter de l'amidon possédant un degré de dispersité tel que ses solutions peuvent traverser des membranes à pores très étroits, telles que les membranes de collodion. Remarquons toutefois que l'on n'est pas encore fixé définitivement sur le point de savoir si le plastide en question forme toujours un tel amidon, et ne produit jamais quelque amidon moins disperse; cet amidon, soumis plus tard à des influences secondaires, prendrait ultérieurement la forme sous laquelle nous avons appris à le connaître comme amidon de pomme de terre par exemple; cette transformation peut d'ailleurs, dans les différents cas, s'effectuer d'une façon plus ou moins complète; il se pourrait aussi que le plastide reproduise chaque fois, de

nouveau, des substances dont les molécules — ou les molates — présententent des dimensions différentes.

Il semble bien que soit cette propriété, soit la grandeur de la transformation dont il vient d'être question, sont liées à une structure stratifiée plus ou moins nette. Cette règle n'est, toutefois, pas rigoureuse; l'amidon de Canna, par example, chez lequel, en règle générale, les couches concentriques sont plus nettement indiquées que chez la pomme de terre, contient indubitablement une proportion plus forte de composants capables de traverser l'ultrafiltre. On peut toutefois se rendre compte, au cours de l'attaque des grains crus par des ferments en solution, que cette structure par couches concentriques exerce une influence réelle sur la marche des phénomènes: on voit alors que les lamelles sont corrodées, suivant les lignes de séparation des anneaux, par fragments successifs; on peut observer même parfois que quelques-unes d'entr'elles, qui présentent probablement un degré de dispersité moins élevé, restent provisoirement intactes. Pour pouvoir expliquer ces faits, ainsi que la nature de la lamellation, il faudra nécessairement étudier d'abord les facteurs qui, dans les grains d'amidon naturel, pourraient éventuellement amener une modification du degré de dispersité de la substance très disperse de l'amidon, au moment où elle se dépose.

Quoi qu'il en soit, la proportion des composants de dispersité élevée est un facteur important de la résistance plus au moins grande que les grains d'amidon crus opposent aux ferments diastasiques; il est établi, en tous cas, que la vitesse de l'attaque par les ferments est proportionnelle à la teneur en éléments de dispersité élevée. Des solutions d'amidon, préparées à chaud, dont la vitesse de réaction est restée à peu près la même, ne contiennent plus ces substances de dispersité élevée. La transformation qu'elles ont subie est réversible, quoique la vitesse de réaction soit très faible. La présence des autres éléments constitutifs de l'amidon est, manifestement, nécessaire à ce point de vue. La raison de ces particularités est encore obscure.

CHAPITRE II.

La lamellation.

§ 1. La lamellation.

Les renseignements précis les plus anciens concernant la lamellation des grains d'amidon sont dus à Nägeli. C'est dans son grand ouvrage qu'il donna la description de cette structure remarquable, qu'aujourd'hui encore on peut considérer comme inexpliquée; ses observations en ce domaine l'amenèrent à formuler sa théorie de l'accroissement des grains d'amidon par intussusception, si souvent combattue, et avec tant de raison. Nägeli s'est attaché plutôt, il est vrai, à la morphologie et au développement des couches qu'à leur nature interne; cependant, certaines de ses observations ont encore aujourdhui leur intérêt au point de vue de nos recherches. Quant à la composition des couches, il se figurait que la différence qui existe d'une couche à l'autre, au point de vue de l'indice de réfraction — c'est ce qui les rend visibles — doit être attribuée à une teneur en eau différente; il ne chercha pas d'ailleurs à découvrir les causes de cette dernière différence. Meyer se plaça, plus tard, au même point de vue, lorsqu'il considéra les grains d'amidon comme des sphérocristaux; il exprima l'opinion que la densité plus ou moins grande des diverses couches est en corrélation avec le degré de développement des sphérites; ce serait le volume et l'épaisseur de ceux-ci, de même que leur abondance relative, qui détermineraient la densité et l'indice de réfraction des différentes couches. On savait déjà, à cette époque, que les couches viennent s'accoler par apposition aux grains en voie de

croissance, par l'activité fonctionnelle des leucoplastes; Meyer fut tout naturellement amené à attribuer les variations de densité de ces cristallisations successives à la composition variable des eaux-mères au sein desquelles elles se produisaient, et cette composition elle-même serait sous la dépendance de l'intensité de l'activité du plastide, sujette à des variations continuelles, et cette intermittence, finalement, dépendrait à son tour de l'apport de matériaux dont le rhythme est déterminé par l'importance relative de l'assimilation et de la respiration.

Réservons la question de la probabilité plus ou moins grande de la nature cristalline de l'amidon; nous n'en avons pas besoin pour expliquer les phénomènes de polarisation; même sur les autres points, l'interprétation donnée par Meyer a été fort discutée en ces derniers temps.

Küster[1] démontre que les couches apparaissent même lorsque les grains d'amidon s'accroissent dans des conditions telles que l'on peut considérer que l'apport de sucre et l'utilisation de celui-ci sont restés constants, pendant toute la durée de l'expérience. Ses essais ont été exécutés sur des points végétatifs de pousses de pomme de terre ne contenant pas d'amidon; celles-ci se nourrissaient aux dépens de solutions de sucre et étaient placées à l'obscurité et à température constante. Les résultats obtenus furent identiques à ceux qu'avaient enrégistrés Salter[2] et Fischer[3] à la suite d'expériences analogues. Le premier de ces deux auteurs avait utilisé de jeunes feuilles de Pellionia, qu'il avait fait jeûner préalablement, et qu'il nourrissait, à l'obscurité, au moyen de sucre. Les expériences de Fischer comportaient, au contraire, un éclairage continu. Ces dernières expériences sont moins démonstratives; les preuves qu'elles apportent ressortent moins nettement, parce que le matériel utilisé est plus compliqué. Les expériences de Küster ne

---

[1] Ber. D. D. botan. Ges.; 1914; XXXI, 339.
[2] l. c.
[3] Beih. z. botan. Centralbl.; 1902, XII, 227.

laissent pas apercevoir la moindre trace des effets produits par l'alternance du jour et de la nuit; il a montré, au surplus, que les grains d'amidon très jeunes possèdent, en règle générale, un nombre de couches plus grand que le nombre de jours qui se sont écoulés depuis leur croissance.

Küster émet l'opinion que l'on a affaire, dans le cas qui nous occupe, à un exemple de «rhythme interne», comparable à ces phénomènes où l'on constate la formation de zones au sein de milieux colloïdaux ou cristallisés, et qui portent le nom d'anneaux de Liesegang. Remarquons que cette opinion ne brille pas d'ailleurs par un excès de lucidité. Küster entend-il par là que le suc cellulaire environnant, soit par le moyen des électrolytes qu'il contient, soit de quelqu'autre manière, provoquerait des modifications chimiques, ou des transformations intéressant la structure colloïdale, lesquelles se manifesteraient alors par la formation de zônes? Ou bien prétend-il dire que les phénomènes rhythmiques observés seraient, au contraire, le résultat des influences exercées par des combinaisons intermédiaires, qui se formeraient et se redécomposeraient constamment? Ou bien encore, suppose-t-il que c'est cette force mystérieuse, inhérente à la matière vivante qui est en jeu ici, cette force qui donne également lieu à des phénomènes rhythmiques au sein de l'organisme animal?

J'estime qu'au point de vue des questions que nous traitons actuellement, la remarque suivante faite par Nägeli[1] est intéressante à noter; la formation de nouvelles couches ne se ferait pas extérieurement, par apposition, mais bien plutôt à la suite d'un processus interne; on peut même donner des preuves directes à l'appui de cette opinion. Beaucoup de grains d'amidon, qui ont atteint déjà une dimension notable, nous apparaissent encore sous un aspect absolument homogène; ce n'est que plus tard que leur contenu se dispose par couches. Les cellules des jeunes écailles du rhizôme de *Dentaria d gitata Lam.* contiennent

[1] l. c., p. 221.

des grains d'amidon, mesurant jusqu'à 16 μ de diamètre, et dont l'aspect est cependant encore homogène; ultérieurement apparaissent, au cours de leur croissance, un hile et une stratification bien reconnaissables; les couches situées vers le centre ont, à ce moment, des dimensions beaucoup plus petites que le grain primitif, avant qu'il ne fût stratifié. Nägeli fait encore les mêmes constatations sur les grains d'amidon des spores non mûres de Chara et d'autres plantes.

Nous avons eu, nous même, l'occasion de faire des observations analogues sur les stolons de la pomme de terre; dans ces organes, on rencontre les grains d'amidon à tous les stades de croissance, depuis des points à peine perceptibles jusqu'à de petits grains, bien formés, et présentant des couches très nettes. Ajoutons, néanmoins, que les grains d'amidon agissant comme autant de petites lentilles qui condensent fortement la lumière, il est très difficile d'observer convenablement les petits détails; cet inconvénient s'atténue beaucoup, d'ailleurs, au fur et à mesure que les grains s'accroissent, et que les surfaces réfringentes de ceux-ci s'aplatissent de plus en plus; il s'ensuit qu'il pourrait fort bien se faire que certains détails ne deviendraient observables que sur des grains déjà relativement gros, alors qu'ils existaient déjà lorsque les grains étaient encore petits.

Les considérations que nous avons développées ci-dessus nous permettent de conclure que la structure lamellaire de l'amidon est la conséquence de causes si profondes, que cette structure se développe même lorsqu'on s'efforce de maintenir les grains dans les conditions les plus constantes possible pendant leur croissance; ou inversément, on pourrait tout aussi bien s'imaginer que cette structure dépend au contraire de causes superficielles, d'ordre exclusivement physique, qui n'ont absolument aucun rapport avec la vie de la cellule. Quoi qu'il en soit, ces expériences ne nous autorisent pas à choisir entre ces deux possibilités; elles ne nous expliquent nullement, non plus, quelles sont les différences dans la nature ou dans la composition des couches qui les rendent visibles pour nous; et ce sont précisément ces

différences qu'il serait intéressant de connaître au point de vue de nos études.

On n'a jamais, jusqu'à présent, résolu la question de savoir quel rôle il faut attribuer au plastide dans la formation de l'amidon et la décomposition de ce produit, qui suit invariablement. Il est admis, assez généralement, que l'une des fonctions du plastide est de sécréter les enzymes dissolvants; cette opinion est basée sur ce fait d'observation que les grains d'amidon qui sont utilisés par la plante et qui disparaissent peu à peu sous l'action des ferments amylolytiques, paraissent toujours entamés le plus profondément au point précis où ils sont en contact avec le corps principal du plastide. On ne sait pas encore, avec certitude, si l'on peut également attribuer à ces enzymes la synthèse de l'amidon. On connaît, toutefois, certaines particularités qui plaident en faveur de l'existence d'un équilibre de concentration, qui s'établirait entre l'amidon et le glucose; cet équilibre pourrait se modifier sous l'action du ferment, qui aurait le pouvoir d'accélérer les réactions, suivant le cas, dans l'un ou dans l'autre sens; cette accélération se trouverait sous la dépendance des facteurs extérieurs, tels que la température, la réaction du milieu, etc. Nous serions cependant plus tenté de croire à une sorte de désintégration du plasma: c'est à dire que le plastide se reproduirait constamment en tant que matière vivante et, en même temps, se décomposerait régulièrement sous l'influence de circonstances déterminées; l'amidon constituerait l'un des produits de cette décomposition; étant stable, il s'accumule et est mis en réserve.

Certaines observations faites par Timberlake[1] semblent nous indiquer cette voie. Cet auteur a constaté que les pyrénoïdes de l'Hydrodiction, qui dans cette algue d'eau douce jouent le rôle de leucoplastes, se différentient très nettement; au moment de produire l'amidon une partie des pyrénoïdes devient trouble et se transforme en amidon. Or les pyrénoïdes sont considérés,

[1] Timberlake. Ann. of botany, 1901, XV, 619.

comme on sait, comme des chromatophores; il semble donc que nous assisterions, dans ce cas, à un passage direct de la substance plasmatique à l'hydrate de carbone.

Si l'on admet que cette transition est possible, il est clair que les expériences de Küster ne peuvent avoir l'importance que cet auteur leur attribue: car nous aurions affaire, dans ce cas, à tout un ensemble, excessivement compliqué, de réactions chimiques, qu'il nous est impossible de dominer assez parfaitement; à plus forte raison, nous ne pourrions décider si les conditions sont telles, à un moment donné, que les réactions ont pu se développer de façon absolument régulière et fournir, conséquemment, des produits absolument constants.

A vrai dire, le même inconvénient existe pour le cas, plus simple, des actions fermentatives réversibles; ici aussi des irrégularités peuvent se produire, p. ex. à la suite de différences qui se manifestent entre la vitesse de diffusion et la vitesse de réaction, irrégularités que nous ne pouvons ni prévoir ni diriger. Lorsque ces irrégularités ont pour effet d'arrêter temporairement la production d'amidon, les éléments constitutifs du suc cellulaire ambiant (électrolytes ou ferments) trouvent amplement l'occasion, pendant ce temps d'arrêt, d'agir sur le produit de la sécrétion; et ils peuvent le faire en le modifiant soit physiquement soit chimiquement, p. ex. par zymophosphatèse.

Admettons présentement, comme point de départ, que le plastide, s'il fonctionnait d'une façon absolument régulière, et si la substance qu'il produit n'était pas exposée à être modifiée par des influences secondaires, ce plastide produirait un grain d'amidon à aspect parfaitement homogène; celui-ci serait constitué, en tout ou en partie par la substance que nous avons appris à connaitre dans le chapitre premier de cette étude, facilement soluble et présentant un haut degré de dispersité. Limitons notre examen, tout d'abord, au rôle des électrolytes; nous pourrons ensuite soumettre à des recherches plus précises les résultats de cette action des électrolytes; nous nous efforcerons, dans ce but, de déterminer la quantité et la nature des com-

posants minéraux, contenus dans les différents amidons que nous voulons comparer l'un avec l'autre.

§ 2. Les électrolytes de l'amidon.

Les renseignements relatifs aux composants minéraux de l'amidon sont très clairsemés dans les ouvrages. Les chiffres donnant le pourcentage des cendres des diverses espèces d'amidon, que l'on trouve mentionnés dans les traités sur la chimie des denrées alimentaires, n'ont aucune valeur à notre point de vue: les analyses sont exécutées, en effet, sur des échantillons d'amidon du commerce, insuffisamment purifiés et modifiés, de plus, par l'action de l'eau de source.

Notre attention a été attirée avant tout sur l'acide phosphorique dont on a déterminé de façon précise, et à plusieurs reprises, le pourcentage pour les grains jeunes et pour les grains plus âgés, ainsi que pour ceux qui avaient subi, préalablement, divers traitements spéciaux; pour autant que nous sachions ces déterminations quantitatives n'avaient jamais porté que sur l'amidon de la pomme de terre. Il nous fallait donc, si nous voulions faire une étude comparative des quatre amidons en question, commencer par exécuter de nouveaux dosages.

La calcination fut toujours effectuée dans le creuset en platine, sur des quantités de 30—50 grammes. Pour doser l'acide phosphorique, nous ne chauffions pas jusqu'à cendres tout-à fait blanches, afin d'éviter des pertes; nous épuisions les cendres par l'eau chaude, puis par l'acide chlorhydrique étendu. L'acide phosphorique était, enfin, précipité de la solution, sous forme d'acide phosphomolybdique, et ce dernier déterminé par titrage d'après la méthode Pemberton-Hissink.

Le poids net des cendres est obtenu en soustrayant du poids total le poids déterminé pour l'acide silicique (silice).

Espèce d'amidon	Poids net des cendres %	Pourcentage de P_2O_5 d'les cendres	Pourcentage de P_2O_5 dans l'amidon
Amidon de pomme de terre	0,27	51,7	0,14
„ „ Canna	0,24	58	0,14
„ „ froment	0,16	50	0,08
„ „ tulipe	0,05	52	0,026

Les cendres de l'amidon de la pomme de terre sont fusibles. $K_4P_2O_7$ contient 43,0% de P_2O_5, et KPO_3 en comporte 60,1%; il s'ensuit que les cendres contiendraient ces deux sels, par portions à peu près égales; on peut se représenter que ceux-ci correspondent à un mélange de KH_2PO_4 et de K_2HPO_4, ou à quelqu'autre combinaison de nature organique, composée d'une manière analogue. Le fer, le calcium et l'acide silicique (la silice) manquent.

Les cendres de l'amidon de froment ne sont pas fusibles. L'eau chaude n'en extrait, pour ainsi dire, aucune matière soluble; on peut constater, il est vrai, la présence de l'acide phosphorique dans la solution, mais en proportion trop minime pour être déterminée quantitativement.

L'acide phosphorique se dissout par le traitement à l'acide chlorhydrique dilué; il est combiné, presqu'en totalité, au calcium. On peut déceler également la présence d'une faible quantité d'acide silicique, dont une partie y existe à l'état amorphe; le reste provient du sable qui est resté adhérent. Lors de la moûture des grains de froment, nous nous sommes efforcé de conduire l'opération de telle sorte que les téguments, assez tenaces, restent, autant que possible, intacts; il n'est pas impossible que, malgré nos précautions, une petite partie de ceux-ci aient été réduits, quand même, en fragments aussi ténus que les grains d'amidon, de sorte qu'ils n'ont pu être enlevés par le lavage ultérieur. L'amidon contient, de plus, des traces de fer.

La quantité de cendres fournie par l'amidon de tulipe est très faible: la proportion totale ne s'élevait qu'à 0,11 %. La différence entre ce chiffre et celui du tableau de la page 39, est imputable à une petite quantité de sable extrêmement fin, cristallisé et parfaitement reconnaissable comme tel, que le lavage n'a pu séparer de l'amidon. Nous avons constaté la présence du potassium et du calcium, ainsi que de traces de fer. Dans les cendres de l'amidon de Canna, enfin, l'acide phosphorique apparaît, combiné au potassium et au calcium. C'est ce dernier métal qui occupe la place la plus importante parmi les cations. Les poids de P_2O_5 qui sont liés au potassium et au calcium sont dans le rapport de 1 à 3,7. On constate la présence de traces de fer. Les cendres contenaient en outre de l'acide silicique (de la silice), qui, sous le microscope, se présentait sous la forme de cristaux, très différents néanmoins de ceux de sable: c'étaient des sphérocristaux, ou des conglomérats de cristaux de forme sphérique, très complexes, et dont le volume était étonnament uniforme. Ces masses cristallines ne se dissolvaient que dans l'acide fluorhydrique, cette solution nous fournit, avec Na, la combinaison cristalline connue; il faut donc considérer ces cristaux comme identiques aux «corpuscules siliceux» découverts par d'autres auteurs chez les Palmiers, les Orchidacées et les Podostémonacées.

Dans l'hypothèse que la totalité de l'acide phosphorique des grains d'amidon est engagée dans des combinaisons organiques, on peut considérer que la quantité d'acide déterminée nous donne une mesure directe de la quantité d'amylopectine contenue dans les grains. D'après Biltz[1] le poids moléculaire de l'amidon qui se colore en bleu par l'iode peut aller de 22000 à 10000; Fouard, de son côté, est arrivé, par des déterminations du point de congélation de ses solutions «véritables» au chiffre de 10000. Ce dernier peut donc être considéré, avec certitude, comme le poids moléculaire minimum. Admettons, en outre, que l'amylose,

[1] W. Biltz. Zur Kenntnis des diastatischen Stärkeabbaues. Ber. d. D. Chem. Ges.; 1913; XLVI; 1532.

qui reste, possède un poids moléculaire identique chez tous les amidons; nous obtenons finalement, comme formule de l'amylopectine: $(C_6H_{10}O_5)_{62}PO_4H_2$. La proportion de P_2O_5 contenue dans cette substance correspond à 0,7%. En prenant ce chiffre comme base, la teneur en amylopectine des divers amidons examinés peut être représentee par les chiffres suivants:

Espèces d'amidon	Teneur en amylopectine
Amidon de pomme de terre	20%
„ „ canna	20%
„ „ froment	10%
„ „ tulipe	3,7%

§ 3. Rôle de l'amylopectine.

Si l'on examine les chiffres donnés ci-dessus, on s'aperçoit qu'il y a bien, en réalité, un certain rapport entre une lamellation nettement indiquée et la teneur en amylopectine, sans qu'il puisse être question, cependant, d'un vrai rapport proportionnel. Remarquons par exemple, à ce point de vue, que l'amidon de la tulipe a une structure lamellaire plus nette que l'amidon du froment, et cependant le premier contient environ 3 fois moins d'amylopectine que le second.

D'autre part, l'amidon de pomme de terre et celui du Canna, qui présentent tous deux une lamellation si prononcée, se rapprochent aussi très fort l'un de l'autre quant à la teneur en amylopectine; tous deux contiennent, au surplus, une proportion d'amylopectine deux fois aussi forte que l'amidon de froment.

Par contre on aperçoit beaucoup moins bien un rapport entre la digestibilité des grains d'amidon crus et leur teneur en amylopectine. L'amidon de la tulipe et celui de Canna réagissent à peu près aussi rapidement l'un que l'autre en présence d'amylase: ils sont, au contraire, placés aux deux extrémités opposées du petit tableau ci-dessus. L'amidon du froment, qui, indubitablement, est attaqué beaucoup plus rapidement que l'ami-

don de la tulipe, contient une proportion d'amylopectine environ trois fois plus importante; l'amidon de la pomme de terre et celui de Canna ont un pourcentage identique d'amylopectine, mais sont attaqués par l'amylase avec des vitesses très différentes.

On peut conclure de ces observations que l'amylopectine est peut-être un des facteurs qui ont contribué à l'apparition de la structure lamellaire, mais qu'elle n'en constitue pas un facteur essentiel; et que la quantité d'amylopectine en présence ne semble exercer pour ainsi dire aucune influence sur la vitesse de l'attaque de l'amidon par la diastase.

Les différences que nous avons constatées dans la teneur en amylopectine, entre les divers amidons, ont cet avantage de nous donner l'occasion d'examiner d'un peu plus près une question, qui peut sembler oiseuse, et qui cependant mérite que nous en disions un mot à cette place: peut-on admettre, sans vérification, que l'amylopectine soit effectivement, comme son nom l'indique, le support des proprietés visqueuses des empois?

Nous avons dit plus haut que Maquenne avait admis l'existence de cette substance, pour expliquer la différence de viscosité qui existe entre les solutions d'amidon naturel et artificiel; cette interprétation est, sans doute, très séduisante, mais l'auteur n'en a, malheureusement, pas donné une démonstration rigoureuse. Les conclusions de Madme Gatin-Gruzewska ne sont pas, davantage, de nature à satisfaire le lecteur: elles sont trop vagues, et ne sont pas absolument d'accord avec les recherches et opinions de Maquenne. Lorsque Samec démontra la présence de l'acide amylophosphorique dans l'amidon, d'une façon plus rigoureuse qu'on ne l'avait fait avant lui, il se montra tout disposé, dès l'abord, à reconnaître cette combinaison comme identique à l'amylopectine hypothétique de Maquenne. Admettons que les considérations développées par Samec dans la «Partie théorique» de ses Etudes, soient réellement d'accord avec les faits observés, il n'en reste pas moins vrai que l'on y cherche en vain un examen un peu circonstancié de différentes questions

importantes: dans quelle mesure l'amylopectine est-elle le support exclusif des propriétés visqueuses? quel est le rapport qui existe entre la concentration de l'amylopectine et le degré de viscosité? existe-t-il d'autres facteurs accessoires, susceptibles de modifier ce rapport?

Puisque, comme il a été établi plus haut, les différents amidons contiennent des proportions d'amylopectine tellement différentes de l'un à l'autre, nous devons nous attendre à trouver la réponse à ces questions par la comparaison du degré de viscosité de leurs solutions.

Nous avons donc, dans ce but, préparé des solutions de ces amidons à 1 %. En opérant la dissolution, nous nous sommes astreint au début à ne maintenir la température d'ébullition que le moins longtemps possible: car nous ne savons pas, avec certitude, quels résultats donnerait une caléfaction plus longue ou une température plus élevée. Samec[1] admet que sous l'action de l'eau chaude l'acide phosphorique peut être éliminé, ce qui correspond à une destruction d'amylopectine; il déclare, d'autre part, qu'il a toujours préparé ses solutions (d'amidon de pomme de terre) en chauffant pendant 2 heures à 120° dans l'autoclave.

Après après chauffé, dans de petits ballons en verre d'Jéna, nous avons soumis les solutions à une centrifugation énergique, dans le but de séparer les pellicules ou les grumeaux qui auraient pu subsister dans le liquide.

Nous nous sommes servi, pour la détermination de la viscosité, de viscosimètres d'après Ostwald, ayant des vitesses d'écoulement, pour l'eau pure, de 42″ et de 70″. Pour effectuer certaines déterminations très précises, nous avons utilisé un appareil ayant une valeur de 3′ pour l'eau. Toutes nos déterminations ont été exécutées en thermostat réglé à 20°. Dans les cas où les poids spécifiques des solutions diffèrent très peu l'un de l'autre ainsi que de celui de l'eau, nous avons négligé ce facteur et

---

[1] Samec. Studien über Pflanzenkolloide IV. Die Verschiebung des Phosphorgehaltes etc. Koll. chem. Beih. 1914, VI, 50.

calculé simplement la viscosité en la considérant comme le quotient des vitesses d'écoulement.

Nous nous sommes aperçu, au bout de très peu detemps, que parmi les conditions qui exercent une influence sur les résultats obtenus, il faut compter la manière dont la solution a été préparée. Nous avons constaté, par exemple, que lorsqu'on verse dans l'eau bouillante de l'amidon de froment, mélangé préalablement avec une petite quantité d'eau, on trouve un chiffre plus élevé pour la viscosité que si l'on opère d'abord le mélange d'amidon et d'eau, qu'on le chauffe ensuite, en l'agitant constamment, jusqu'à l'ébullition, et qu'on le laisse, enfin, bouillir encore pendant le même laps de temps que précédemment (5 minutes). Dans le premier cas, la dispersité des parties résistantes s'effectue plus complètement, probablement en raison du gonflement brusque des grains. On peut s'en rendre compte lorsqu'on opère la centrifugation dans de petits tubes (éprouvettes), placés l'un vis à vis de l'autre. Dans le premier cas, on observe qu'il se forme un précipité, d'ailleurs difficile à voir, qui occupe toute une moitié de l'éprouvette; dans le second cas, la «gélification» se fait lentement, mais il s'est formé, par contre, un dépôt beaucoup plus dense, qui s'est accumulé jusque dans la pointe du tube à essai, et sur une longueur de quelques centimètres. De plus la liqueur surnageante est un peu moins opalescente que dans la «gélification» à chaud. Aussi, nous nous sommes décidé à préparer, dès lors, toutes nos solutions d'après la première manière indiquée plus haut.

Nous avons pu juger de l'importance d'un autre facteur encore: la durée de l'ébullition. Par la différence des résultats observés, obtenus pour des déterminations effectuées en double, nous avons constaté que les réactions qui provoquent la transformation de l'amidon en empois (la «gélification» de l'amidon) et qui déterminent le degré de viscosité, ne sont pas terminées encore au bout de 5 minutes d'ébullition: pour obtenir le chiffre maximum, il faut chauffer beaucoup plus longtemps. Le lecteur pourra s'en rendre compte par l'inspection du tableau ci-dessous:

Durée de l'ébullition	Amidon de froment		Amidon de tulipe	
$^1/_2$ heure	$\eta = 3.0$	3.1	$\eta = 2.8$	4.1
1 „	2.6		2.9	2.9
$1^1/_2$ „	3.3	3.3	3.4	
3 „	3.2		3.3	
$4^1/_2$ „	2.8		—	

On voit donc que la viscosité a une tendance à diminuer d'abord, puis à augmenter pour redescendre encore, et cette fois définitivement, si l'on continue à chauffer. Ce fait est encore plus net pour des périodes d'ébullition plus courtes, de 5 minutes par exemple. Dans ces conditions, l'amidon de la tulipe fournit des chiffres tels que 4.0 et 5.1. Ces valeurs élevées s'observent parfois encore après une $^1/_2$ heure d'ébullition, comme on peut le constater par le tableau ci-dessus. Il faut probablement attribuer ces coefficients élevés du début à cette circonstance qu'à ce moment toutes les membranes n'ont pas encore cédé ou ne se sont du moins pas toutes dissoutes, de sorte que le passage à travers le tube capillaire est difficile. Quant au deuxième abaissement du degré de viscosité, il pourrait militer en faveur de l'opinion émise par Samec et d'après laquelle, lorsqu'on chauffe en présence d'eau, une partie de l'acide phosphorique se séparerait; on pourrait cependant l'expliquer tout aussi bien en supposant que des transformations internes s'accomplissent dans les molécules de l'amylose, qui s'accompagneraient de modification des caractères externes: on peut se figurer p. ex. qu'il se formerait des combinaisons comparables aux lactones ou d'autres analogues. On sait que pour d'autres colloïdes lyophiles également les propriétés chimico-colloidales se modifient à la suite d'une ébullition prolongée. C'est ainsi que la gélatine, p. ex., perd son pouvoir gélatinisant; ce dernier exemple est d'ailleurs très connu.

Pour l'amidon de Canna et de la pomme de terre, avec leur système de lamelles si clairement développé, nous devons prévoir

une influence initiale beaucoup plus importante sur le chiffre de la viscosité. Nous avons constaté, cependant, que même pour ces amidons ce facteur disparaît lorsqu'on maintient l'ébullition pendant longtemps, et la liqueur prend alors un aspect différent: elle devient moins vitreuse et les contours vagues disparaissent complètement. Pour effectuer la dissolution de l'α-amylose, il n'est donc pas absolument indispensable de chauffer à 138°, comme Meyer l'affirme: cette température élevée favorisera, néanmoins, la désintégration des utricules, qui s'opérera beaucoup plus rapidement.

Durée d'ébullition	Amidon de Canna	Amidon de pomme de terre	
$^1/_2$ heure	$\eta = 8.6$	$\eta =$ —	
1 „	—	7.1	
$1^1/_2$ „	4.8	—	
2 „	2.9	6.0	8.1
$3^1/_2$ „	2.6	5.4	5.7

Ces chiffres nous permettent de constater qu'il y a, réellement une viscosité initiale élevée, que l'on doit attribuer à une destruction incomplète des grains. Il est arrivé, parfois, que les grains d'amidon de la pomme de terre existaient encore après une ébullition de 2 heures. Si l'on prolongeait l'ébullition pendant assez longtemps, la viscosité diminuait finalement quand même, comme pour les autres amidons, tout en restant néanmoins notablement plus élevée que pour ces derniers, après une ébullition de durée équivalente.

Nous pouvons, actuellement, comparer les diverses données recueillies jusqu'à présent. Constatons tout d'abord qu'au point de vue de la viscosité l'amidon de pomme de terre occupe une position toute spéciale; à cet égard, il s'éloigne autant des autres amidons que par la manière dont il se comporte vis-à-vis de la diastase, ainsi que nous l'avons remarqué plus haut. Il semble bien qu'il n'y ait pas de rapport bien net entre la viscosité et la teneur en amylopectine. L'amidon de Canna devrait, en effet, se

comporter, dans le viscosimètre, de la même façon que l'amidon de pomme de terre; il présente, au contraire, une viscosité qui se rapproche de celle de l'amidon de la tulipe ou du froment; ces deux derniers amidons, à leur tour, diffèrent beaucoup moins entre eux que le tableau ci-dessus ne le faisait prévoir.

Il ressort de ces observations que la viscosité n'est pas proportionelle à la concentration de l'amylopectine dans les solutions. Il y a donc lieu de rechercher quels sont les autres facteurs dont l'influence détermine la conduite chimico-colloïdale de ces solutions.

---

§ 4. Facteurs qui déterminent la viscosité de l'amylopectine. Origine de la lamellation.

A la suite des recherches qui ont été faites relativement aux propriétés chimico-colloïdales des solutions d'albuminoïdes, on sait que la viscosité minima correspond au point iso-électrique; l'addition à ces solutions, soit de bases, soit d'acides, par la formation de complexes (ions) porteurs d'une charge électrique, fait monter le degré de viscosité. On impute ce résultat à la tendance qu'auraient les ions de se combiner avec le dissolvant, en formant des hydrates de volume plus considérable. L'identité des effets produits, dans ce cas, par les acides et par les bases, est dû au caractère amphotère des albumines.

Si l'on compare ces observations avec les résultats obtenus par les déterminations de la viscosité de l'amidon, on constate une certaine analogie entre les deux séries. Samec a constaté que l'addition d'un acide abaisse le degré de viscosité des solutions d'amidon de pomme de terre. Le fait est déjà facilement observable pour un acide de concentration correspondant à 5.10^{-5} N. Si l'on augmente cette concentration (jusqu'à 0,1 N), la viscosité s'abaisse de façon constante. Samec, pour expliquer ce phénomène, admet que lorsqu'on acidifie la solution, l'acide amylophosphorique, moins dissocié, serait expulsé de ses sels et mis en liberté; au fur et à mesure que la concentration des

ions augmente, l'ionisation de l'acide amylophosphorique diminue de plus en plus, de sorte que le nombre de groupes sans charge électrique devient de plus en plus important. C'est une interprétation analogue que Samec invoque pour expliquer l'influence exercée par les bases; celles-ci, si à des concentrations faibles elles provoquent une certaine augmentation de la viscosité, c'est parce qu'elles neutraliseraient l'acide phosphorique non combiné; à des concentrations plus élevées, elles amènent, au contraire, une diminution de la viscosité, en s'opposant à l'ionisation; à des concentrations encore plus fortes ces bases font monter rapidement le degré de viscosité, grâce à la formation d'alcoolates fortement hydratés.

On ne voit pas très bien cependant comment il est possible d'accorder cette interprétation avec l'action stabilisatrice qu'exercent les acides sur la viscosité; on sait que, sans l'intervention des acides, celle-ci diminue rapidement avec l'âge des solutions (rétrogradation). Cette action des acides s'affirme déjà nettement à une concentration de 5.10^{-4} N. de l'acide. C'est, cependant, le contraire que l'on devrait attendre; on serait tenté d'attribuer plutôt ce caractère de stabilité aux solutions fortement ionisées; car l'attache qui lie l'ion au dissolvant est, comme on sait, beaucoup plus forte et plus durable en règle générale.

L'addition d'alcalis, au contraire, amène, comme l'a montré Maquenne, une augmentation de la rétrogradation — et cela jusqu'à la concentration de 1.10^{-3} N.; les concentrations plus élevées ralentissent la rétrogradation, et la concentration de 0,1 N l'arrête, pour ainsi dire, complètement. L'influence exercée par les sels sur les solutions d'empois nous semble tout aussi contradictoire. Le sulfocyanate ammonique a la propriété de faire gonfler fortement les substances colloïdales; il favorise, pour certaines substances solides, telles que l'amidon p. ex., la formation de pseudo-solutions; et cependant ce sel ne s'oppose pas, de façon notable, à la rétrogradation; le sulfate ammonique par contre, qui se trouve placé à l'extrémité opposée de la série lyotrope, a une action nettement stabilisatrice.

Quoi qu'il en soit, ce qui précède montre à suffisance que de très petites différences dans le degré d'acidité peuvent provoquer des modifications de η même chez les amidons; aussi, lorsqu'on voudra apprécier les différences de viscosité existant entre des solutions naturelles d'amidon, il faudra tenir compte également de ce facteur, car les grains d'amidon peuvent retenir, à l'état non combiné, une portion plus ou moins grande de l'acide amylophosphorique.

Au sujet des renseignements relatifs à cette question, il y a lieu de faire les mêmes remarques qu'à propos des analyses des cendres: il n'existe de déterminations précises que pour l'amidon de pomme de terre; elles sont dûes à Fernbach et Wolff[1]. Connaissant les résultats obtenus dans les analyses des cendres, nous ne pouvions nous attendre à trouver des différences importantes, tout au moins pour l'acidité potentielle; pour l'acidité titrable, elle augmentera ou diminuera évidemment avec la proportion de P_2O_5 contenue dans les grains. Cette dernière acidité a été déterminée par titration de solutions d'amidon concentrées dans de l'eau neutre[2] au moyen d'une solution alcaline à $^1/_{100}$ N et la phénophtaléine l'ialcalinité fut dosée par titration au moyen d'une solution acide à $^1/_{100}$ N et l'orange de méthyle comme indicateur.

Espèces d'amidon	Centim. cub. de la solut. alcal. $^1/_{100}$ N. par 10 gr. d'amidon	Centim. cub. de la sol. acide $^1/_{100}$ N. par 10 gr. d'amidon	Rapport
Am. de pomme de terre	20	12	1.66
Canna	17.6	14	1.21
froment	16.6	8	2.1
tulipe	8.5	6	1.4

[1] Compt. rend. Acad. Sc. 1905; CXL; 1403.

[2] C'est-à-dire privée d'anhydride carbonique par distillation, et donnant une réaction neutre en présence du rouge de méthyle.

Il ressort de ces chiffres que les diverses espèces d'amidon réagissent de la même manière sur les deux indicateurs: leur réaction est acide avec la phénolphtaléine, et alcaline avec l'orange de méthyle: l'acidité potentielle, d'autre part, est différente de l'un à l'autre, comme le prouvent les chiffres de la dernière colonne. Dans les différents amidons, la proportion d'acide phosphorique combiné varie, et nous devrions constater ces différences, en employant un indicateur tel que l'azolithmine. En pratique nous n'avons pas réussi à observer de variation de la coloration: c'est en vain que j'ai cherché à l'obtenir, soit en essayant de colorer directement les solutions d'amidon cru au moyen d'une solution concentrée de l'indicateur, puis en lavant à fond par centrifugation en présence d'eau neutre, soit en mélangeant de l'empois concentré avec l'indicateur.

Nous nous sommes mis alors à rechercher quelle est la relation qui existe entre l'acidité (le caractère acide) des grains et leur coloration sélective par les colorants organiques, dont un si grand nombre ont été essayés par les divers expérimentateurs; c'est au cours de cette recherche que nous avons découvert par hasard, un jour, un mémoire de Blunck[1] sur cette question; cet auteur recommande comme colorant spécifique de l'amidon de pomme de terre le rouge de métachrome «Agfa». Ce réactif ne colorerait, en jaune intense, que l'amidon dont nous venons de parler et les tissus, à l'exclusion des autres amidons. L'article, très court, de Blunck ne donne aucun autre détail sur le phénomène de coloration, ni au sujet des propriétés du colorant, découvert tout récemment. Blunck indique cependant que l'amidon de froment se colore également lorsque le milieu est acide; il conseillé de laver superficiellement les grains au moyen d'un alcali, si l'on veut éviter cette coloration.

Le rouge de métachrome se dissout dans l'eau en lui communiquant une coloration jaune-rougeâtre; la solution mousse quand on l'agite. Les acides comme les alcalis font disparaître cette

[1] Blunck. Ein neues Färbeverfahren für Kartoffelstärke. Zeitschr. Unters. Nahr. Genussmittel 1915, 246.

coloration rouge, qui passe au jaune. La solution du phosphate secondaire bimétallique de sodium se colore en rouge pur, celle du phosphate monométallique en jaune pur. En employant un mélange de ces deux sels, on obtient toute la riche gamme des tons intermédiaires. En milieu neutre, $(H) = 1.10^{-7}$, c'est-à-dire en présence d'eau neutre ou d'un mélange de phosphates de composition correspondante, le liquide se colore en rouge-jaunâtre, comme nous l'avons dit déjà; la teinte intermédiaire (saumon) correspond à $(H) = 0,2.10^{-6}$. A $(H) = 0,4.10^{-6}$ correspond une coloration jaune intense. Ces colorations se manifestent aussi dans les milieux où la concentration des ions H est faible, tels que par exemple les solutions de phosphate sodique bimétallique ou d'acétate sodique. En solution alcaline 0,001 N p. ex. le liquide ne prend plus que la coloration intermédiaire.

Nous avons traité nos amidons, nous conformant en cela aux prescriptions de Blunck, pendant 8 minutes par la solution du colorant indiquée par lui; celle-ci a été préparée en partant d'une solution saturée du colorant en question dans l'alcool à 30%, auquel on ajouta 25% d'eau. Les amidons furent lavés ensuite, par centrifugation en présence d'eau neutre, jusqu'à ce que celle-ci restât incolore. L'amidon de froment était coloré en rouge-brique, celui du *Canna* et de la pomme de terre avaient pris une teinte qui en différait bien peu, d'une nuance un peu plus jaunâtre; l'amidon de tulipe était jaune. Sous le microscope, nous ne sommes pas parvenu à obtenir de coloration, si ce n'est en prolongeant très longtemps (1 heure) l'action du colorant; c'est l'amidon de pomme de terre qui, dans ces conditions, présente la coloration la plus intense. Lorsqu'on transforme préalablement les amidons en empois, au moyen d'eau neutre, et qu'on ajoute alors le rouge de métachrome, en solution, en guise d'indicateur, l'amidon de tulipe présente, cette fois encore, la même divergence que plus haut: il se colore en jaune, comme le ferait le phosphate monométallique de sodium. Les amidons de *Canna*, de pomme de terre et de froment prennent des colorations qui s'accordent avec les chiffres pro-

4*

portionnels donnés plus haut. L'amidon de Canna donne la coloration la plus neutre, l'amidon de froment la plus «acide», l'amidon de pomme de terre prend une teinte intermédiaire entre les deux autres.

On pourra conclure de ce qui précède que l'acidité des amidons étudiés par nous, quoiqu'ayant une valeur différente pour chacun d'eux, oscille entre des limites trop étroites (elle varie entre (H) = 10^{-6} et 10^{-7}) pour provoquer des divergences dans la viscosité; on peut admettre, en effet, que la concentration des ions $H^{\cdot}$ doit être comprise entre 1 et 5.10^{-5} pour exercer une influence appréciable. Remarquons, en outre, que ce n'est pas l'amidon de pomme de terre, malgré sa viscosité plus grande (dépassant de loin celle des autres amidons) mais bien l'amidon du froment qui possède le degré d'acidité plus fort; il faut donc définitivement rayer le degré d'acidité de la liste des facteurs capables de faire varier la viscosité.

La proportion d'acide amylophosphorique qui est neutralisée ne joue donc aucun rôle; par contre, la nature du cation qui a fixé cet acide a une influence sur le cours des phénomènes. Les analyses ont démontré que l'amidon de la pomme de terre diffère de tous les autres, en ce que les cendres ne contiennent que du potassium. Les autres amidons contiennent du calcium; l'amidon du froment, qui est le plus facilement attaquable par les solutions d'amylose, et qui présente la lamellation la moins nette, ne contient même que du calcium exclusivement. On aimerait en conclure que la présence de l'amylophosphate de calcium communique à la solution des propriétés moins visqueuses et que sous l'influence de ce sel, et précisément comme conséquence de ces propriétés spéciales, les micelles auraient une tendance moindre à se rapprocher pour former des couches denses et cohérentes. Pour notre part, nous nous figurons assez volontiers que, pour l'une ou l'autre raison, l'amylophosphate potassique l'agglutine plus facilement et plus complètement que le sel de calcium de ce même acide. Si les lamelles de l'amidon de pomme de terre sont plus agglutinées dans leur portion interne, il s'ensuivra qu'elles

seront plus difficilement perméables pour les liquides, et partant, plus difficilement attaquables. Les agrégats compacts se disloqueront plus difficilement par l'ébullition; c'est ainsi que les grumaux d'empois qui subsistent pendant un certain temps au cours de l'ébullition, ne subissent, finalement, la «dispersion» que très lentement. Nous croyons avoir établi la justesse de cette interprétation par l'expérience suivante: après avoir fait bouillir pendant longtemps une solution d'amidon de pomme de terre, de façon à détruire toutes les membranes, nous y avons versé du $CaCl_2$ en quantité exactement calculée; cela signifie que nous avons utilisé le poids de $CaCl_2$ exactement nécessaire pour transformer l'amylophosphate potassique en sel de calcium correspondant, mais trop faible, d'autre part, pour amener une modification de la viscosité simplement en vertu de l'influence qu'il exerce par lui-même en tant que sel. Il s'ensuivit une baisse brusque et immédiate de la viscosité, comme le montrent les chiffres suivants:

Amidon de pomme de terre à 1%	$\eta = 3.2$
id. après avoir ajoute 0,1 mgr. de $Ca\,Cl_2$ pour 10 cm^3 de solution et fait bouillir un instant	$\eta = 2.3$

Nous avons fait bouillir ensuite une solution d'amidon de froment, à laquelle nous avons ajouté, après cela, de l'oxalate de potassium, en quantité exactement calculée; nous n'avons, cette fois, obtenu aucun relèvement du degré de viscosité, conformément d'ailleurs à nos prévisions; en faisant rebouillir la combinaison potassique qui a pu se former, nous avons empêché l'agglutination de se produire, car l'ébullition est plutôt de nature à la contrecarrer.

§ 5. Rôle des ferments.

Il est donc établi que c'est du potassium qu'émane l'influence prépondérante sur la force de résistance des lamelles; cette nouvelle question se pose actuellement, de savoir si c'est à la

structure physique, exclusivement, que l'on doit attribuer cette influence — qui dépendrait, dans ce cas, de la nature des ions en présence — ou si, au contraire, l'amidon ne serait pas soumis, au sein des membranes relativement solides, à des modifications intramoléculaires, ou à des phénomènes de coagulation qui seraient indépendants des actions électrolytiques. Nous ne pouvons oublier la recommandation faite par Fernbach et Wolff lors de la découverte de l'amylo-coagulase: quiconque voudra étudier l'amidon, disaient-ils, aura désormais à compter avec l'influence possible de cette substance.

Nous nous aventurons cependant par là sur un terrain très incommode. Dans un de leurs derniers mémoires, Fernbach et Wolff[1] ont, notamment, attiré l'attention sur la présence nécessaire et obligatoire d'une diastase liquéfiante dans le milieu, pour que la coagulase extraite de froment, d'orge ou de seigle non maltés puisse agir; on peut introduire cette diastase, p. ex. sous la forme d'un extrait de malt que l'on a affaibli en le chauffant à 75°.

Si l'on veut attribuer un rôle à la coagulase dans la formation des lamelles, il faudra donc admettre que le grain d'amidon en voie de croissance reste en contact permanent avec l'enzyme diastatique. Nous avons déjà eu, plus haut, l'occasion de faire allusion à la probabilité plus ou moins grande de cette interprétation, et nous avons conclu, alors, que la question est bien loin d'être résolue. La découverte de Fernbach et Wolff ne pourra guère contribuer, pensons-nous, à la résoudre, parce qu'elle donne trop de prise à la critique et repose très probablement sur une interprétation erronée des faits.

Lorsqu'on veut répéter les expériences auxquelles nous venons de faire allusion, on éprouve fortement l'impression qu'il ne s'agit pas ici de coagulation, dans le sens que Fernbach et Wolff attachent à ce terme; on est amené à penser plutôt à un

[1] Fernbach et Wolff. Sur la coagulation diastasique de l'amidon — Compt. Rend. Acad. Sc. 1904; CXXXIX; 1219.

phénomène de rétrogradation accélérée, qui serait produit, non pas par un enzyme coagulant, mais par un ferment amylolytique; celui-ci se trouvant placé dans des conditions très défavorables, ne pourrait que provoquer un commencement d'hydrolyse, mais ne serait plus capable d'achever celle-ci. On sait que l'action des enzymes diastasiques sur une solution d'empois est toujours marquée, au début, par un abaissement rapide du degré de viscosité, de sorte que, très peu de temps après l'addition de la solution des ferments, la viscosité de la solution d'empois est très voisine de celle de l'eau.

En ce moment, il ne s'est pas encore produit la moindre parcelle de maltose ou de quelqu'autre substance réductrice; l'amidon se trouve alors, à notre avis, dans la même situation qu'une solution d'empois rétrogradée que l'on a rendue claire par l'action de la chaleur; cette solution contient également de l'amylose dissoute, mais ne possède plus aucune viscosité, tout comme une solution, préparée à chaud, d'amidon que l'on aurait préalablement soumis à la gelée.

Dans les deux cas on se trouve en présence de molécules — ou agrégats — très gros à l'état dissous, mais sans hydratation appréciable, et, par conséquent, peu stables. En réalité, les solutions dont nous avons parlé en dernier lieu abandonnent, au bout d'un temps très court, leur amidon en se refroidissant, et celui-ci forme alors un dépôt dont l'aspect rappelle à tous égards celui de l'amidon coagulé.

Nous avons exécuté nos expériences sur trois amidons différents, à savoir ceux de la pomme de terre, du froment et de la tulipe; aux solutions à 4 % de ces amidons, nous avons ajouté $^1/_{20}$ de leur volume d'une macération à 10 % de malt fraichement moulu. Les mélanges des deux liquides furent alors recouverts de toluol, et maintenus dans une étuve réglée à 25°.

La rétrogradation normale s'accomplit, pour ces divers amidons, avec des vitesses inégales. Les solutions à 1 % des amidons de pomme de terre ou de froment, préparées par ébullition prolongée pendant 1 heure, puis stérilisées, n'ont pas encore fourni

de précipité après un repos de 50 jours; et cependant leur viscosité a diminué dans de fortes proportions; les solutions d'amidon de froment, au contraire, se sont scindées complètement, au bout du même laps de temps, en leurs composants primitifs, et se présentent sous l'aspect d'un liquide aqueux, dont s'est séparé un précipité volumineux floconneux, aux contours nets. De telles divergences, si tranchées, ne se produisent pas dans la coagulation. Il nous a semblé, au surplus, que celle-ci peut être influencée par des circonstances accessoires très peu importantes; telle solution d'amidon de froment se coagulait nettement, telle autre se séparait bien en ses constituants mais ne formait pas de précipité. Les amidons de pomme de terre et de tulipe se sont précipités, dans toutes nos expériences.

Wolff et Fernbach affirment que la coagulase, qui reste insensible à de nombreuses substances (les auteurs ne nous disent pas quelles substances ils ont essayées), est rendue inactive par de très faibles quantités d'un acide ou d'une base. Il suffirait de $^1/_{1000}$ d'acide acétique ou de soude pour empêcher toute coagulation. Cette observation n'est pas absolument exacte. Lorsqu'on utilise de l'amidon déminéralisé et que la réaction du milieu est réglée sur 0,0001 N, on voit le liquide devenir épais et se troubler uniformément, sans que, cependant, on puisse parler d'une floculation nette, ni que le moindre dépôt se produise. Il y a donc, en réalité, une coagulation de la solution, mais la «gelée» est pour ainsi dire peptonisée par les ions $H^{\cdot}$ et reste en suspension. Si l'on répète l'expérience en additionnant le liquide de quelques gouttes d'une solution d'oléate sodique, la précipitation s'opère très nettement.

Nous inspirant de la fixation de l'amylase par les sucres à fonction aldéhydique (glucose, maltose), rapportée par Wohl et Glimm[1], nous avons examiné, à ce point de vue, l'amidon de tulipe, qui se coagule si bien; nous avons utilisé des solutions

[1] Wohl et Glimm. Zur Kenntnis der Amylase. Bioch. Zeitschr., 1910; XXVII; 349.

contenant 15 $^0/_0$ de glucose et 15 $^0/_0$ de saccharose. Au début, l'expérience de contrôle (c. à. d. celle qui comportait un milieu exempt de sucre) manifesta un trouble notablement plus accentué et, en outre, une floculation plus abondante et une précipitation plus facile. La solution était déjà trouble après une demi-heure; l'essai au saccharose était moins modifié, celui au glucose ne présentait encore aucun changement. Au bout de quelques jours de repos des solutions, maintenues stériles, dans l'étuve réglée à 25°, on ne pouvait plus distinguer aucune différence entre les trois tubes.

On voit donc que les phénomènes de coagulation et de dissociation sont influencés de la même manière par les aldoses; le fait est d'autant plus remarquable qu'il s'agit ici d'une action spécifique; il semble bien, d'après cela, qu'il y ait un rapport entre ces enzymes, sinon même identité.

Cette interprétation pourrait nous fournir une explication toute prête des réactions amorcées à l'avance, signalées par Fernbach et Wolff; il s'agit notamment d'un phénomène de coagulation, qui se continuait encore lorsque on tuait le ferment peu de temps après l'avoir introduit; il n'est pas facile de faire rentrer un tel phénomène dans le cadre des réactions de la coagulase. C'est encore vers cette même interprétation que nous sommes orientés à la suite de l'observation suivante faite par Lisbonne[1]: la salive, entièrement purifiée par dialyse, ne deviendrait capable d'opérer la coagulation, d'après cet auteur, qu'après qu'elle a été rendue légèrement amylolytique, par adjonction d'une trace d'un électrolyte. Dans ces expériences, le ferment placé vis-à-vis d'amidon dissous est très dilué et affaibli; l'action que le ferment exerce, dans ces conditions, serait comparable à l'attaque des grains d'amidon crus par des ferments en solution; là aussi, le ferment se trouve placé dans des conditions désavantageuses vis-à-vis de certaines portions

---

[1] Lisbonne. Coagulation de l'amidon par la salive et le suc pancréatique — Compt. rend Soc. de biolog; 1911; LXXI; 140.

des grains, plus denses et plus résistantes; et ces portions sont abandonnées par le ferment dans un état de «rétrogradation». Il existe des grains d'amidon qui présentent une structure stratifiée nette; et cependant ces grains se sont développés dans des conditions telles qu'il est impossible d'admettre qu'ils ont été soumis à des attaques intermittentes et localisées de la part des ferments; il s'ensuit que nous pouvons, avec une très grande probabilité, éliminer l'action des ferments comme facteur de l'apparition de la lamellation.

§ 6. Conclusion.

Somme toute, il résulte des pages précédentes, qu'à côté du facteur que nous avons élucidé dans le chapitre premier, c'est la nature des cations contenus chimiquement dans l'amidon qui doit occuper la place la plus importante dans l'interprétation que l'on donnera de la vitesse inégale de l'attaque des grains d'amidon cru; ce sont, en effet, ces cations qui, malgré les quantités excessivement faibles en présence, déterminent l'état dans lequel se trouve l'amylopectine. Cette dernière substance peut être plus ou moins agglutinée, et, conséquemment, plus ou moins perméable. Cette agglutination atteint son maximum quand l'amylopectine est combinée au potassium, comme c'est le cas dans l'amidon de pomme de terre. La présence d'amylophosphate de calcium a pour conséquence de rendre les lamelles plus poreuses; dans les cas où, comme cela a lieu pour l'amidon de froment, l'amylopectine est composée exclusivement de sel calcique, les lamelles n'opposent plus aucune résistance à la pénétration de l'amylase. Cette circonstance entraîne à sa suite un développement tout différent des phénomènes d'érosion. Après un contact très court, l'amylase réussit à creuser des galeries jusque dans l'intérieur des grains, qui s'effondrent; au contraire, lorsque les micelles des lamelles sont plus agglutinées, la diffusion s'opère plus lentement, et l'amylase ne peut, alors, attaquer qu'une lamelle à la fois.

La nature spécifique des lamelles se trouve ainsi, peut on dire, expliquée pour une grande part; par contre, les recherches auxquelles nous nous sommes livré ne nous ont pas encore mis à même de répondre à la question de savoir quelle est la cause de la structure stratifiée de l'amylopectine, dont la résistance est variable. Devons-nous en chercher l'explication dans une neutralisation rhythmique de l'acide amylophosphorique, distribué d'une façon uniforme à travers la masse des grains? Ou bien, devons nous nous imaginer plutôt que c'est l'acide qui, par suite de sa distribution même à travers les grains d'amidon, constituerait les lamelles, et que le phénomène de neutralisation n'interviendrait pas par lui-même? Ou faut-il invoquer d'autres raisons encore? Nous renvoyons le lecteur désireux de trouver réponse à ces diverses questions au chapitre III, § 5.

Ou peut, en tout cas, considérer comme certain que les ferments ne jouent aucun rôle dans la genèse de la lamellation, ni les ferments amylolytiques, ni les ferments coagulants; l'existence même de ces derniers est devenue, d'ailleurs, très problématique, ainsi qu'il résulte du dernier § du présent chapitre.

CHAPITRE III.

La pellicule externe.

§ 1. Aperçu général.

Les pages qui précèdent ont montré qu'il n'était pas nécessaire, pour expliquer les grandes divergences dans la résistance opposée par les divers amidons à la pénétration des solutions des ferments, d'admettre l'existence d'une couche distincte, d'une pellicule externe autonome entourant les grains; celà ne signifie pas, néanmoins, que l'on doive exclure la possibilité de l'existence d'une telle pellicule autour des grains d'amidon, notamment, qui se montrent le plus résistants; aussi il nous a semblé convenable de rencontrer ici les arguments qui ont été mis en avant en faveur de l'existence de cette couche externe, et de les soumettre à un nouvel examen. Remarquons tout d'abord, que si l'on veut étudier la digestion des grains d'amidon in situ, il est indispensable de tenir compte également du plastide, qui, d'après les recherches cytologiques, doit être considéré comme une membrane fermée, entourant le grain de toutes parts. Pour les grains isolés de leur milieu cytologique, il n'y a plus lieu de compter avec cet organe. A part les possibilités prévues par Beyerinck, on peut considérer comme établi que, lorsqu'on détruit les cellules et que l'on lave les grains à l'eau, cette mince couche protoplasmique, très fragile, sera régulièrement, et sans exception détruite en même temps: c'est ce qu'on voit très clairement sur des coupes de la tige de Pellionia Daveauana. Dans les cellules qui n'ont pas été ouvertes, chaque grain d'amidon porte un

plastide coloré et par conséquent bien visible; les grains qui sont sortis des cellules ont, au contraire, déjà perdu ce plastide. Il semble que le contact qui existe entre le grain d'amidon et le plastide soit extrêmement fragile, et, de son côté, l'assemblage plasmatique est également très labile dans l'eau.

Comme nous l'avons mentionné brièvement déjà dans l'introduction, des observations ont été faites par divers expérimentateurs, qui semblent indiquer que la couche périphérique pourrait avoir une composition différente; nous possédons, dès à présent, plusieurs hypothèses qui peuvent expliquer ces phénomènes.

Reichert attribue beaucoup d'importance à cette «capsular layer»; il estime même que cette couche spéciale, qui existe autour de tous les grains d'amidon, constitue dans tous les cas une «protective covering» définitive à l'égard des attaques des enzymes; voici comment il résume les arguments qui militent en faveur de son existence[1]. La couche externe serait relativement peu soluble dans l'eau froide ou chaude, peu perméable aussi et peu attaquable par les enzymes et les acides faibles. Dans certaines circonstances, elle fournit des réactions colorantes spéciales et oppose une résistance plus grande à l'action de l'hydrate de chloral et d'autres réactifs; toutes les causes, d'autre part, qui entament la continuité de cette couche, telles que trituration avec du verre ou du sable, érosion des grains par les bactéries, dissolution par la potasse etc. — rendent aussi les grains colloïdalement solubles dans l'eau.

Si nous y réfléchissons bien, la différence qui subsiste n'est pas fort importante conformément aux lois de la chimie colloïdale; il est clair qu'une solubilité plus grande ou plus facile d'un des composants de l'amidon signifie un gonflement plus rapide par l'hydrate de chloral ou par les solutions salines, puisque nous devons considérer ce gonflement comme un phénomène entièrement analogue à la dissolution, ou plutôt comme une

---

[1] l. c. p. 80.

forme spéciale de dissolution. La question de la perméabilité à l'égard des solutions de ferments a été traitée déjà dans le chapitre précédent, à l'occasion de la discussion des relations existant entre la composition des lamelles et la manière de se comporter des grains d'amidon. Il s'ensuit que ce ne sont pas seulement les lamelles extérieures seulement, mais toutes les lamelles qui peuvent faire valoir leur influence à ce point de vue; nous pouvons finalement nous demander s'il est logique d'appuyer spécialement encore sur ce terme de «couche externe» et de distinguer encore explicitement celle-ci des lamelles placées plus à l'intérieur. Ne conviendrait-il pas, plutôt, de parler de la «lamelle extérieure»? Dans les échantillons d'amidon sur lesquels nous expérimentons, il y a des grains à tous les stades de développement; tous se comportent de la même manière, à la seule condition d'être intacts; ils possèdent donc tous cette «couche externe» qui, d'ailleurs, si nous n'étions intervenus pour interrompre la croissance de ces grains, serait bientôt devenue une des lamelles internes.

Cette équivalence de toutes les lamelles intérieures et de la lamelle externe n'est pas davantage en contradiction avec la dernière parmi les affirmations de Reichert; on peut bien admettre que la trituration, p. ex., aura déchiré, non seulement la lamelle extérieure, mais toutes les lamelles, permettant ainsi le contact de la substance relativement peu résistante avec les réactifs qui attaquent les grains.

Cette équivalence, qui nous semble logique, se montrera-t-elle compatible avec la plus importante des remarques faites par Reichert, notamment la possibilité d'une coloration différentielle des grains d'amidon.

Nägeli avait déjà remarqué que les solutions d'iode très diluées pénètrent à l'intérieur des grains et les colorent en bleu, mais en laissant, en règle générale, le bord extérieur incolore. Cette observation fut confirmée, dans la suite, à plusieurs reprises, et cela pour d'autres réactifs encore; divers chercheurs attirèrent l'attention sur ce fait que certaines matières colorantes

du groupe de l'aniline laissent également incolore le bord extérieur; celui-ci peut même, par l'emploi simultané de plusieurs colorants appropriés, prendre une coloration différente de celle des portions internes. Si ces observations sont exactes, elles constituent effectivement un argument sérieux en faveur de l'existence d'une couche externe, différente du reste du grain, soit par sa constitution chimique, soit par sa structure physique.

---

§ 2. Coloration différentielle des grains d'amidon.

Meyer mentionne, dans l'ouvrage que nous avons cité déjà à plusieurs reprises, des expériences de coloration au moyen du violet de méthyle; Salter[1] fut, cependant, le premier qui appliqua à l'examen des tissus contenant de l'amidon les nouvelles méthodes pour fixer, faire les coupes et colorer. Pour obtenir la coloration des plastides, Salter employa la fuchsine acide ou la ferrohématoxyline, qui attaquent peu les grains d'amidon. Celui-ci a beaucoup plus d'affinité pour le violet de gentiane ou la safranine; pour obtenir la coloration par contraste de la couche externe, il a utilisé l'orange G ou l'éosine. A l'aide de ces colorants, Salter examina des coupes à travers les tissus de la pomme de terre, ainsi que de *Canna*, *Adoxa*, *Phaius* et *Pellionia*, dans lesquels les grains d'amidon se présentaient à différents stades de leur développements.

Salter aurait constaté que les très jeunes grains d'amidon de pomme de terre laissent voir, lorsqu'on les traite par le violet de gentiane, un large bord qui ne se colore pas; seul le centre du grain montre une petite région colorée en violet. Il en est de même des jeunes grains des autres espèces d'amidon que nous venons d'énumérer. Salter en conclut que ces observations sont d'accord avec celles de Nägeli et de Schimper et que, dans la

[1] Salter. Zur näheren Kenntnis der Stärkekörner. Jahrb. f. Wiss. Bot. 1898; XXXII, 117.

mesure ou l'on peut admettre que les réactions colorantes puissent être considérées comme critérium, les grains les plus jeunes sont, dans tous les cas, compacts et homogènes. Au cours du développement ultérieur des grains, quelques lamelles colorables apparaissent autour du hile, tandis que la région du bord reste toujours compacte et incolore.

Lorsque les grains deviennent adultes, le nombre de lamelles qui se colorent augmente; cependant il reste toujours, au bord extérieur, une région assez large qui ne se colore pas, même dans les grains les plus volumineux, tout au moins pour l'amidon de pomme de terre et celui de l'*Adoxa*. L'amidon de *Canna* présenterait, d'après Salter, une exception remarquable, en ce que cette région incolore fait défaut dans les grains adultes; il semble même que ce soient précisément les couches placées vers l'extérieur des grains qui se colorent le plus intensément. Un examen plus attentif lui permit cependant de constater que, même dans ce cas, il y avait une couche incolore, très mince, qui entourait complètement le grain.

Il est au moins étonnant que Denniston[1], qui a précisément travaillé sur l'amidon de *Canna*, ne fait aucune mention de ce fait. Il déclare que certaines couches, qui semblent être simples lorsqu'on les observe dans l'eau, apparaissent composées après coloration. Il a vu par exemple que, dans l'eau, les grains apparaissent entourés d'un couche fortement réfringente, laquelle, après coloration par l'iode, se montre constituée d'une couche extérieure, bleu-clair et d'une seconde, située vers l'intérieur, bleu-foncé. Cette dernière se colorait en bleu par le violet de gentiane, alors que la première restait incolore; celle-ci prenait, après celà, une teinte orange si l'on faisait agir l'orange G. Ces observations ne cadrent pas très bien avec celles de Salter, si tant est que cette couche extérieure soit bien aussi mince que l'affirme Salter.

Lorsqu'on se donne la peine de répéter ces diverses expérien-

[1] Cité par Reichert, l. c. p 57.

ces, on est frappé de constater quelle image peu claire elles nous donnent des phénomènes. En règle générale, le violet de gentiane est facilement absorbé par les grains, tandis que l'orange G — un colorant acide — ne les colore pas, du moins pas de façon assez durable pour que la coloration résiste à un lavage à l'eau. On peut laisser séjourner les grains d'amidon pendant des jours dans une solution saturée du colorant; si on les lave ensuite superficiellement, et qu'on les examine au microscope, ils ne montrent plus trace de coloration; s'il existait vraiment une couche ayant de l'affinité pour les colorants acides, celle-ci devrait forcément se manifester, à la suite d'un traitement de ce genre.

Si l'on colore les grains au moyen du violet de gentiane, qu'on les lave ensuite et qu'on fait agir après cela l'orange G, on assiste à un refoulement progressif du colorant basique par la matière colorante acide, ce qui semble indiquer que l'affinité des deux colorants l'un pour l'autre est plus grande que l'affinité de l'amidon pour le violet de gentiane. Dans aucun des amidons examinés, nous ne sommes parvenu à voir le bord jaune décrit par Denniston. Le colorant violet joue, manifestement, dans une certaine mesure, le rôle de mordant, ce qui a pour effet que les grains ont vu s'augmenter quelque peu le pouvoir de retenir la matière colorante jaune isolément. C'est pourquoi on peut, dans une préparation qui contient des grains d'amidon de toutes dimensions, observer toutes les nuances intermédiaires possibles entre le bleu et le jaune. En règle générale, on aperçoit mieux le jaune au centre des grains, tandis que les bords présentent une teinte plus violacée. Si l'on prolonge plus longtemps le traitement par l'orange G., la coloration violette disparaît de plus en plus, et ne persiste plus, finalement mêlée à un peu de jaune, que dans ces lamelles-là qui sont tout spécialement chromophiles; ces lamelles ressortent dès lors d'une façon excessivement nette.

Quant au bord incolore, nous ne l'avons jamais observé que dans certains grains, contenus dans des préparations d'amidon de pomme de terre et de *Canna*. C'étaient précisément ceux

qui laissaient voir, par leur formes anormales et leur aspect inhabituel, qu'ils étaient déjà fortement entamés par la plante elle-même et érodés déjà, dans une telle mesure, par les ferments, que toutes les substances relativement disperses ainsi que les matières superficiellement actives avaient disparu de la couche externe. Les grains de ce genre sont en très petite minorité, même dans l'amidon des tubercules qui ont poussé déjà de longs jets, et sont devenus tout à fait spongieux. Les autres grains d'amidon ne se sont jamais montrés pourvus de ce bord incolore. Nous devons confirmer, néanmoins, ce fait que, dans les grains qui ne sont pas très colorés, on peut apercevoir une zone marginale claire; celle-ci, dans certains cas, peut même paraître tout-à fait incolore, mais elle n'est jamais jaune. Il convient toutefois de supprimer par la pensée l'influence pertubatrice de la ligne de Beck, cette ligne fortement lumineuse qui apparaît à la limite de deux milieux de réfringence inégale.

C'est probablement à cette zone diffuse que Salter fait allusion dans les recherches que nous avons rappelées plus haut; pour notre part, elle nous a aussi semblé plus grande dans les grains jeunes, et nous sommes en mesure de confirmer le fait que, dans les grains d'amidon adultes de *Canna*, elle est extrêmement mince. A notre avis cependant, cette apparence n'est nullement due à une densité plus forte, à une affinité moindre des couches extérieures pour la matière colorante; elle a tout simplement, sa raison d'être dans la forme sphérique des grains. L'épaisseur que doit traverser le rayon lumineux est plus considérable au milieu que sur les bords; ces derniers paraissent, par conséquent, incolores lorsque l'intensité de leur coloration n'atteint pas un certain minimum. Et, en réalité, on n'observe plus de bord clair quand les grains ont été très fortement colorés.

Notre interprétation trouve une confirmation de plus dans l'emploi de l'éclairage latéral; dans ces conditions, le bord incolore disparaît, mais d'un côté seulement, et l'exception frappante que présentent les grains de *Canna* y trouve tout-à-coup une explication imprévue. Ces grains, ainsi qu'on peut

le prouver en provoquant des courants dans le liquide ambiant, ne sont pas sphériques, mais aplatis, et leur forme rappelle un peu celle des écailles des poissons. Il s'ensuit que l'épaisseur des couches que le rayon lumineux doit traverser n'est pas beaucoup plus forte au centre que dans la région marginale; celle-ci ne peut donc apparaître que sous la forme d'une ligne très étroite.

Si nous comparons, à présent, nos résultats avec ceux des expérimentateurs qui nous ont précédé, il apparaît clairement qu'ils n'en constituent nullement une confirmation. Nous n'avons pas pu constater une divergence de structure de la couche externe, qui se manifesterait par une affinité plus grande pour les matières colorantes acides. Aussi bien, Salter lui-même se montrait déjà sceptique à cet égard. Nous lisons, dans son mémoire (p. 120), ce qui suit: «La coloration double ne réussit que de temps en temps, et paraît, dans une certaine mesure, affaire du hasard». Nous pouvons, croyons-nous, conclure sans danger de ce passage, que le «hasard» en question aura consisté en un lavage trop peu complet de la solution concentrée du colorant. Plus loin (p. 139) Salter revient encore sur cette question, et répète qu'il ne faut pas avoir une grande confiance dans la colorabilité de la couche externe; il conclut comme suit: «en un mot, lorsqu'on réussit à colorer le bord, la coloration qu'il prend est exactement la même que celle des lamelles denses; toutefois le bord est d'habitude un peu plus clair, de sorte qu'il aurait une densité encore plus forte que les lamelles». Nous savons maintenant, par tout ce qui précède, que cette conclusion repose sur un malentendu.

Beaucoup plus démonstratifs sont les phénomènes observés par Unna; s'appuyant sur des méthodes de coloration très spéciales, il réussit à déceler la présence simultanée dans le pain de guerre d'amidon de pomme de terre, de froment et de seigle, indépendamment l'un de l'autre[1]. Lorsqu'on suit strictement ses indications, on aperçoit, après avoir coloré, un bord blanc autour

[1] E. Unna. Mikroskopisch-färberischer Nachweis von Weizen-, Roggen- und Kartoffelstärke nebeneinander — Z. U. N. G. 1918; XXXVI, 49.

des grains d'amidon de pomme de terre, et autour de ceux-là seulement. D'après cette méthode, le colorant semble se limiter, pour les grains d'amidon de pomme de terre, aux couches situées vers l'intérieur; ces dernières se détachent, de la sorte, très nettement, sur la lamelle ou les lamelles extérieures non colorées. Le procédé préconisé par Unna peut se résumer à peu près comme suit. Après un traitement préalable, pendant 24 heures, par une solution de phénol à 3%, on colore la préparation en la laissant séjourner pendant au moins 10 minutes dans une solution de «Wasserblau», d'orcéine et d'éosine, dans un mélange d'eau, d'alcool et de glycérine; la préparation de ce réactif est donnée avec tous les details nécessaires. On lave, puis on colore encore une fois la préparation, en la plongeant pendant 10—15 minutes dans une solution de safranine; on lave de nouveau; enfin, et cette opération constitue un des points les plus essentiels du procédé d'Unna, les objets sont mordancés par un séjour de 20—30 minutes dans une solution de bichromate de potassium à 0,5%. L'amidon de pomme de terre prend une teinte rouge intense. Autour de chaque grain on constate la présence de la zone non colorée de largeur uniforme dont nous avons parlé déjà et qui est limitée, sur son pourtour extérieur, par une ligne bleue irrégulière, très fine. Celle-ci est dûe à des restes de plastides, qui ont une grande affinité pour les matières colorantes acides, rouges et bleues, qui entrent dans la composition du premier bain. La présence de cette couche protoplasmique pariétale excessivement mince — qui est beaucoup plus clairement visible chez l'amidon de froment — avait déjà été observée précédemment par Salter, chez les grains d'amidon de *Canna*, après coloration au moyen de la fuchsine acide ou de l'éosine. Dans l'amidon, à l'état isolé, préparé comme nous l'avons indiqué plus haut, nous n'avons jamais observé que les grains fussent enveloppés par cette substance colorée en bleu: une preuve de plus que notre supposition était fondée, et que la couche plasmatique est enlevée par l'eau de lavage lorsque les cellules s'ouvrent. Les grains d'amidon du froment se colorent en rose,

tandis que, pour les grains d'amidon du seigle, le traitement par le bichromate provoque la métachromasie de la safranine qui donne une coloration jaune-brun. La présence du manteau blanc qui enveloppe les grains d'amidon de pomme de terre constitue, d'après cet auteur, une preuve en faveur du bien-fondé de l'hypothèse de Beyerinck. Remarquons toutefois que Beyerinck admet la présence, dans ce manteau incolore des grains d'amidon, d'albumine incrustée, qui est précisément la substance qui se colore en bleu intense dans le bain colorant acide; on devait donc s'attendre à ce que ce manteau ait également une tendance à se colorer en bleu. C'est ce que nous n'avons jamais eu l'occasion d'observer, dans aucun des cas que nous avons examinés. Il est une autre considération, qui plaide encore davantage contre l'interprétation d'Unna, c'est que nous avons pu constater que la couche incolore n'existe pas, avant le traitement au bichromate. Nous nous sommes aperçu qu'on pouvait, sans préjudice, simplifier les opérations et laisser de côté, entre autres, le traitement préalable, qui est très minutieux, et le bain colorant acide; au point de vue des faits qui nous intéressent, ces divers traitements n'ont, en réalité, d'autre raison d'être que de colorer les substances albuminoïdes existant dans le pain. Quant à la coloration des grains d'amidon, elle est dûe à la seule safranine, exclusivement. Lorsqu'on fait baigner les grains d'amidon de pomme de terre dans une solution à 1 °/₀ de cette matière colorante, les grains se colorent entièrement en rouge intense — à condition que le bain ait duré assez longtemps. La lamellation est devenue nettement visible. On lave ensuite les grains à fond, en centrifugant à plusieurs reprises en présence d'eau distillée, puis on les plonge dans la solution de bichromate; on remarque alors qu'au bout d'un certain temps la matière colorante est partiellement extraite. Sur toute la surface des grains, la coloration est plus claire; quant à la région voisine du bord, au bout d'une demi-heure à trois-quarts d'heure, elle s'est décolorée complètement. La limite entre la zone colorée et la portion incolore est, en règle générale, nettement tranchée, et marquée par une lamelle

de teinte foncée. En même temps, on voit se former, à la surface des grains, de petites aiguilles, de couleur foncée, composées probablement de chromate de safranine: c'est la même substance insoluble que l'on voit se produire quand on mélange, dans le tube à essai, des solutions de safranine et de bichromate potassique. Si l'on prolonge la durée du bain de bichromate, la zone incolore s'élargit de plus en plus, jusqu'à ce que finalement les lamelles centrales, qui sont les plus chromophiles, restent seules colorées. Au bout d'une nuit, les grains sont complètement décolorés. Om est évidemment tenté de conclure de là que la combinaison par absorption amidon-safranine est relativement peu stable, et que la coloration ne résiste pas en présence de la solution de bichromate; c'est ce qui a induit Unna en erreur. La matière colorante ne pouvait pas en effet être extraite complètement des grains après le mordançage par le chromate, dont la durée a été fixée un peu arbitrairement.

On peut faire d'ailleurs des observations analogues sur les grains d'amidon, colorés d'abord en bleu par le violet de gentiane et traités ensuite par le bichromate; la décoloration produite par l'orange G, dont nous avons parlé plus haut, est basée sur les mêmes réactions.

§ 3. La paroi des vésicules des grains d'amidon «gélifiés».

On peut conclure des paragraphes qui précèdent qu'aucune des observations publiées jusqu'à présent n'est de nature à démontrer rigoureusement la présence d'un manteau réfractaire enveloppant les grains d'amidon. Cela est vrai non seulement d'observations instituées dans ce but exprès, mais aussi de toutes celles qui ont pu être faites occasionnellement au cours de recherches sur quelqu'autre sujet. Il convient toutefois de ne pas perdre de vue que ces observations sont toutes basées sur l'emploi des méthodes par coloration; celles-ci, malgré leur caractère uni-

latéral, nous apporteraient effectivement un moyen sûr d'atteindre le but poursuivi; toutefois il faudrait s'assurer au préalable que les interprétations courantes correspondent à la réalité au sujet de la nature de la couche externe. S'il se confirmait notamment que celle-ci est bien une incrustation d'albuminoïdes ou de matières tannantes, il est évident que ces substances, qui constituent des mordants excellents, interviendraient non seulement pour modifier, sur place, les propriétés chimico-colloïdales de l'amidon, mais influenceraient nécessairement aussi leur pouvoir de fixation des matières colorantes, en le renforçant. Rappelons-nous que c'est grâce à leurs incrustations que les fibres de jute ont acquis les mêmes propriétés que les fibres de coton fortement mordancées.

Ces diverses considérations nous porteraient à écarter délibérément toute la question de l'existence d'une couche externe autonome, si nous n'en étions empêchés par le phénomène qui se produit, lorsqu'on procède avec précaution à la «gélification» des grains d'amidon. Ceux-ci, dans ces conditions, se transforment, comme on sait, en vésicules remplies de liquide; le fait est connu depuis longtemps, mais Beyerinck vient de rappeler tout récemment l'attention sur lui.

Dans les préparations qui ont été soumises à une ébullition relativement courte, puis refroidies, elles se présentent sous l'aspect d'utricules un peu affaissées sur elles-mêmes, qui se contractent visiblement lorsqu'on ajoute des électrolytes; de la sorte, ils se séparent du milieu ambiant, au sein duquel ils se déposent, en diminuant en même temps de volume; Beyerinck a observé ce phénomène dans tous ses détails et d'une manière systématique dans ses études de «sédimentation».

Si l'ébullition se prolonge, les parois vésiculaires s'amincissent rapidement et deviennent mucilagineuses; dès ce moment elles ne sont plus visibles, ni à l'oeil nu ni au moyen d'instruments, que pour une incidence bien déterminée de la lumière, à cause de leur pouvoir réfringent très faible. Elles ne tardent pas à se désagréger en petites particules, qui ne sont plus visibles au

microscope, dans les conditions habituelles; elles n'en peuvent pas moins, cependant, exercer encore une influence considérable sur le degré de viscosité. Nous nous en étions aperçu déjà précédemment et nous avons eu l'occasion de confirmer le fait, d'une façon plus précise, quand nous avons découvert le moyen de rendre ces objets visibles; voici comment nous avons procédé. On commence par déposer sur le verre porte-objet une grosse goutte de la pseudo-solution; puis, sur la même lamelle, on place une goutte plus petite d'une solution concentrée d'un électrolyte. Ouvrons maintenant l'iris tout large, puis manoeuvrons le bouton du diaphragme jusqu'à ce que les rayons lumineux, tombant obliquement, fassent ressortir fortement le relief. En ce moment nous amenons sous l'objectif les deux gouttes en contact l'une avec l'autre, au moyen d'une aiguille très fine; il faut avoir bien soin d'opérer avec la plus grande prudence, de manière à ce que la largeur du passage ainsi établi entre les deux gouttes reste microscopique. Cela peut réussir dans certains cas. On voit alors, immédiatement, les utricules, devenues tout-à-coup nettement visibles, se déplacer tout en se contractant et traverser le passage étroit, au milieu d'un courant de matière granuleuse; cette dernière, de son côté, est devenue plus dense à la suite de son contact avec la solution d'électrolyte, et plus visible à cause même du mouvement régulier et ordonné auquel elle prend part.

Du fait que ces très fins éléments mobiles ne sont devenus visibles qu'après addition d'un électrolyte, nous pouvons conclure tout-de-suite que la contraction des utricules closes est un phénomène du même ordre: il doit être plutôt de nature chimico-colloïdale que de nature osmotique[1]; et cette manière de voir se trouvera encore confirmée quand nous aurons constaté que les non-électrolytes (sucre, urée, alcool etc.) n'exercent

[1] D'après l'interprétation exposé par Katz dans la dissertation (Over het oudbakken worden v. h. brood ... Amsterdam 1917), 2e partie, p. 116, ce serait précisément la tension osmotique qui jouerait un rôle important dans le gonflement des utricules de l'empois. Le lecteur trouvera, dans ce travail, de bonnes figures relatives à ce phénomène.

qu'une action bien faible sur cette contraction et que les utricules sont très perméables pour les colloïdes, pour le tannin par exemple.

Le moment semble venu de chercher à répondre à ces questions: De quoi ces utricules sont-elles composées? Sont-elles identiques avec la couche externe, hypothétique? Quel rapport existe-t-il, éventuellement, entre cette couche externe et les utricules? Nous devons, pour y arriver, examiner d'un peu plus près l'origine, la composition et les propriétés des parois vésiculaires; ce sera l'occasion de reprendre et de réexaminer les diverses hypothèses — auxquelles nous avons fait allusion déjà précédemment — qui ont été proposées relativement à la nature de la couche externe.

§ 4. Origine des parois vésiculaires.

Les phénomènes qui se déroulent au cours du gonflement des grains d'amidon ont été assez exactement représentés par Nägeli (l. c. pl. XIII) et par Kraemer[1]. Les premiers signes qui se manifestent sont mieux représentés par Nägeli: c'est, notamment le gonflement progressif de la partie du grain qui est la plus éloignée du hile, et qui prend finalement la forme d'une massue; par contre cet auteur n'a pas bien rendu un autre phénomène que nous avons observé bien des fois, et chez tous les amidons que nous avons eu l'occasion d'étudier; ce phénomène, Kraemer a tenté de le représenter (fig. 6), mais, visiblement, sans le comprendre: c'est la déchirure en zig-zag qui se produit dans la paroi des lamelles situées plus à l'intérieur. Ce fait est dû, à notre sens, à ce que les couches externes s'imbibent rapidement, et se distendent fortement; il s'ensuit que la longueur de leur diamètre augmente; comme le gonflement s'opère, en ce cas, plus rapidement que la diffusion des liquides

[1] Kraemer. The structure of the starch grain. Botan. Gaz., 1902, XXXIV, 341.

vers l'intérieur, les portions internes ne peuvent suivre le mouvement: il se produit alors des déchirures suivant des lignes régulières, séparant les parties internes des lamelles extérieures, qui se dilatent. On peut faire les mêmes constatations, lorsque le gonflement s'opère moins rapidement: la diffusion de l'eau, même dans ce cas, ne suit que lentement. Il se produit, de la sorte, une sorte de vide dans ces grains et la partie qui se distend s'aplatit, à la manière d'un ballon de caoutchouc dont on retire le gaz. Si l'on examine la préparation sous un éclairage oblique, la ressemblance est frappante. Lorsque le gonflement est modéré, les grains arrondis, de petit volume, rappellent des globules sanguins; dans les grains à moitié adultes, seule la portion élargie en massue est aplatie; quant à ceux qui ont été vidés complètement de leur contenu, ils nous apparaissent sous la forme d'utricules aplaties. Peu à peu, ils se remplissent d'eau, et reprennent alors leur aspect normal.

Le procédé le plus facile pour observer ces phénomènes consiste à plonger pendant un instant dans un tube à essai, contenant de l'eau bouillante, une petite quantité d'amidon de pomme de terre ou de *Canna* tenu en suspension; de cette façon, la «gélification» ne se fait pas complètement et l'empois obtenu n'a pas l'aspect vitreux. Il est assez étonnant que ces faits aient échappé à tous les chercheurs qui nous ont précédé. Nägeli va même jusqu'à affirmer que ce sont les portions internes qui gonflent le plus rapidement, et qui parviennent finalement à rompre les couches externes, plus lentes à se dilater; se seraient alors les couches internes qui se répandraient au dehors. Nous avons assisté bien des fois au gonflement de l'amidon, sans jamais avoir pu observer ce phénomène.

Nous pouvons, maintenant, comprendre clairement comment se forme la paroi de la vésicule. Les parties externes du grain se distendent; elles se détachent en même temps de la masse centrale, ou restent adhérentes à celle-ci; dans l'un comme dans l'autre cas, il se produit un vide à l'intérieur du grain; l'eau chaude, ou tout autre liquide que l'on aurait utilisé pour faire

gonfler l'amidon, est donc aspirée, pour ainsi dire, à l'intérieur. En traversant cette paroi, elle enlève à celle-ci et entraîne avec elle les substances dispersibles; il en résulte que, lorsque la gélification sera achevée, la membrane ne se composera plus que des éléments difficilement solubles provenant de différentes parties des grains, et notamment des lamelles les plus résistantes; tous ces éléments se trouveront agglutinés en une masse homogène.

La paroi vésiculaire serait composée, de la sorte, par les membranes dont il a été question ci-dessus (chap. II), agglutinées ensemble; il s'ensuit que c'est en analysant celles-ci que nous arriverons à résondre le problème relatif à la distribution de l'acide phosphorique dans le grain.

---

§ 5. Composition de la couche externe et des parois vésiculaires.

Plusieurs chercheurs ont, avant Beyerinck, attiré l'attention sur la présence dans l'amidon de très faibles quantités d'azote combiné; Beyerinck toutefois fut le premier à considérer cet azote comme partie intégrante du grain d'amidon, et non comme des traces d'impuretés provenant de restes des cellules, dont on n'avait pu se débarrasser. Nous avons fait allusion, dans la préface, au rôle de cette albumine, car c'est sous cette forme que Beyerinck se figurait l'azote combiné; nous avons également dit un mot de l'hypothèse d'après laquelle cet azote serait localisé dans la couche épidermique. Beyerinck lui-même s'est rendu compte, d'ailleurs, des inconvénients inhérents à cette manière de voir; on ne s'explique pas bien le comment et le pourquoi de ce déplacement continuel de l'albuminoïde vers la périphérie des grains en voie de croissance; il en est de même encore des résultats de ses analyses, qui ne donnent pas un pourcentage d'azote nettement différent pour les parois vésiculaires isolées des grains d'amidon gélifiées, et pour l'amidon cru, complet.

Beyerinck a cru, néanmoins, pouvoir maintenir son hypothèse; c'est pourquoi il nous a semblé utile de vérifier celle-ci par d'autres voies, et d'essayer notamment, par l'emploi de réactifs colorants des albuminoïdes, d'en déterminer éventuellement la localisation sous le microscope. Ces essais ne nous ont, malheureusement, donné aucun résultat. Parmi les diverses réactions par coloration connues, trois seulement nous ont paru utilisables dans le cas qui nous occupait.

La réaction de Krasser est basée sur la coloration rouge que prend l'albumine, en présence d'une solution alcoolique d'alloxane; l'essai que nous avons fait sur l'amidon de la pomme de terre resta toujours absolument négatif, même lorsque nous prolongions l'opération pendant longtemps.

Le réactif à la ninhydrine d'Abderhalden fut essayé sur l'amidon de pomme de terre en voie de gélification; cet amidon possède, comme on sait, une couche externe plus épaisse que n'importe lequel des autres, et devrait, par conséquent, contenir la plus forte proportion d'albumine; ce réactif ne nous donna qu'un empois épais, d'une coloration verdâtre faible. Quant au réactif de Millon, employé sous forme concentrée, nous l'avons préparé en faisant dissoudre, au bain-marie, quelques cristaux de nitrite de sodium dans une solution saturée de nitrate mercurique; ce réactif nous a donné une coloration nettement rose. Ces deux dernières réactions fournissent donc un résultat faiblement positif, mais il ne nous fut pas possible de déterminer si les colorants produits par ces réactions sont distribués d'une façon homogène à travers les grains. L'interprétation que nous avons donnée plus haut de l'origine des parois vésiculaires est de nature à énerver les objections soulevées par Beyerinck même; d'autre part, nous devrions dans ce cas abandonner l'idée d'une «couche externe», attendu que l'azote serait distribué uniformément dans tout le grain. Quant à la preuve apportée par Unna, en faveur de l'hypothèse de Beyerinck, nous l'avons réfutée déjà au § 2.

Dans tous les cas, cette hypothèse, quoique improbable, est

cependant plus intelligible que celle de Jentys. On ne voit pas bien, notamment, comment les grains peuvent être tannés, si le suc cellulaire ne contient pas de tannin. Voilà cependant le cas qui se présente dans les stolons de la pomme de terre. L'amidon que ces organes contiennent, nous nous en sommes assuré, est tout aussi inattaquable par la diastase que celui du tubercule; nous n'avons, cependant, jamais réussi à déceler la présence de tannin dans le suc cellulaire des stolons, tandis que nous en avons trouvé dans le tubercule. La présence constante du tannin dans la substance du plastide est, au surplus, extrêmement improbable pour peu que l'on veuille tenir compte de l'antagonisme prononcé qui existe entre l'action du tannin et celle des ferments dont parle Jentys, et d'autre part, du fait que les grains résistent, à tous les stades de leur croissance; il faudrait donc qu'ils fussent protégés par une couche externe incrustée de tannin pendant toute la durée de leur développement. Nous avons réexaminé, d'après la méthode indiquée par Jentys, l'amidon des tubercules de pomme de terre que nous avions préparé en prenant toutes les précautions que nous avons déjà exposées plus haut. Le suc cellulaire, au moment où il devient libre, fut dilué immédiatement au moyen d'une grande quantité d'eau, et on ne le laissa d'ailleurs que le moins longtemps possible en contact avec les grains. Nous n'avons pu en isoler aucun produit donnant des réactions colorées avec F_2Cl_3; il est donc probable que Jentys aura utilisé de l'amidon qui se sera souillé en absorbant du tannin au cours de la préparation.

Pour étudier de plus près les parois des vésicules, au point de vue de l'origine de la lamellation (cf. notre chap. II), nous avons estimé que la méthode Gatin-Gruzewska ne pouvait donner de bons résultats; car il nous est impossible de prévoir quel sera l'effet produit sur l'éther de l'acid phosphorique par l'emploi successif d'un alcali fort et d'un acide. Nous avons donc utilisé la contraction que subissent les vésicules sous l'influence des sels minéraux; parmi ceux-ci, nous avons fait choix de $CaCl_2$, parce que des expériences comparatives de sédi-

mentation avaient prouvé que ce sel agit le mieux en solution diluée, contrairement aux observations faites à ce sujet sur de nombreux sels inorganiques; Madme Gatin-Gruzewska, d'autre part, a montré que l'eau de chaux précipite l'amylopectine.

Nous avons mélangé 75 gr. d'amidon de pomme de terre, pur, préparé par nous-même, avec la plus petite quantité possible d'eau distillée; le mélange, nous l'avons ensuite versé, en ayant soin d'agiter constamment, dans 5 litres d'eau distillée à 90° C. Après gélification, la température était de 80°. L'examen microscopique nous fit voir que les vésicules avaient fortement gonflé, tout en restant encore nettement reconnaissables comme telles. Nous avons alors refroidi rapidement le liquide dans l'eau froide, et, lorsque la température fut redescendue à 30°, nous y avons ajouté un volume tel d'une solution de chlorure de calcium, que la teneur du liquide en $CaCl_2$ fut de 0,25°/₀. Après avoir agité énergiquement le liquide avec du toluol, nous l'avons enfin mis en réserve dans un vase de verre cylindrique étroit.

Lorsque la précipitation fut achevée, le volume du dépôt était de 160 centim. cub. Celui-ci fut lavé, à plusieurs reprises, par décantation au moyen d'eau distillée, puis évaporé au bain de vapeur, séché, et enfin pilé.

La teneur de ce précipité en P_2O_5 s'élevait à 0,20°/₀. On pourra constater que ce chiffre est plus élevé d'environ 50°/₀ que celui qui correspond à la teneur en P_2O_5 de la substance primitive (P_2O_5 = 0,14°/₀): les membranes résistantes contiendraient donc effectivement plus d'acide amylophosphorique; la divergence n'est, toutefois, pas aussi importante que ne semblaient le faire prévoir les propriétés de ces membranes, si différentes de celles des autres parties des grains d'amidon. L'agglutination, que nous avons étudiée au chapitre II, dépendrait donc, principalement, d'une distribution par zones des métaux K et Ca; il est néanmoins possible qu'il y ait d'autres causes encore de ce phénomène.

Nous pouvons, jusqu'à un certain point, considérer la substance sécrétée par le plastide comme une solution colloïdale

concentrée d'amylose et d'acide amylophosphorique; il convient, d'autre part, de tenir compte des forces qui agissent à la surface de pareilles solutions; ces forces sont capables d'opérer des modifications importantes dans la couche limitante, qui se traduisent éventuellement par la formation de membranes solides, plus ou moins résistantes.

D'après le théorème de Gibbs on peut prévoir une accumulation de substance solide dans la couche superficielle, si cette substance est susceptible de diminuer la tension superficielle. Tel est le cas de l'amidon, comme l'ont montré les mensurations de Zlobicky[1]. De son côté, Ramsden, étudiant parmi beaucoup d'autres substances l'amidon (en solution aqueuse à $^1/_4{}^0/_0$), constata la formation à la surface de celle-ci d'agrégats mécaniques solides superficiels[2].

Pour notre part, nous préférons employer l'expression de «couche superficielle visqueuse»; car on doit se figurer, nous semble-t-il, ces surfaces comme tout-à-fait différentes de la couche qui se forme à la surface des solutions de fuchsine: cette dernière se déchire facilement et se laisse traverser par une goutte d'eau qui tombe; elle présente alors des fissures radiales que l'on peut rendre visibles par certains procédés spéciaux, quand le liquide est incolore[3].

Lorsqu'un plastide, après avoir sécrété une certaine quantité de substance, suspend ensuite pendant un certain temps ses fonctions, la surface nouvelle qui vient de se former reste au repos pendant quelques heures. Il est tout naturel de croire que, pendant cette période d'inactivité du plastide, les forces molé-

---

[1] Zlobicky. Détermination de la tension capillaire par la méthode des petites bulles. Bull. intern. Acad. Sc. Cracovie 1906. p. 497.

[2] Ramsden. Abscheidung fester Körper in den Oberflächenschichten von Lösungen und „Suspensionen". Beobachtungen über Oberflächenhäutchen, Blasen, Emulsionen und mechanische Koagulation. Zeitschr. f. phys. Chem. 1904, XLVII; 336.

[3] Nagel. Über die Bildung fester Oberflächen auf Flüssigkeiten. Ann. d. Phys. 1909, XXIX; 1029.

culaires vont poursuivre leur action et qu'il va se produire une accumulation des substances les plus actives au point de vue des forces superficielles, telles que les sels potassiques de l'acide amylophosphorique; grâce à leur concentration élevée, ces sels se sépareront bientôt, partiellement, de la solution et conflueront.

Lorsque de la matière amylacée fraîchement formée viendra s'adjoindre aux couches anciennes, elle ne pourra plus modifier ces agrégats résistants, et ceux-ci persisteront dès lors, dans les grains, sous la forme de lamelles résistantes. On peut supposer raisonnablement que le sel calcique de l'acide amylophosphorique est moins actif que le sel potassique de cet acide, au point de vue des forces superficielles: la chose n'est pas improbable, vu la faible solubilité de cet acide et sa floculation en solution concentrée, sous l'influence des ions Ca; cette hypothèse nous fournirait une explication facile de la lamellation moins parfaite de certains amidons, de la résistance et de la fermeté moindres comme de la perméabilité plus grande des membranes dans la composition desquelles entrent ces sels calciques.

---

§ 6. Propriétés des parois vésiculaires.

Les détails donnés ci-dessus, au sujet de la composition de la matière dont est formée la paroi vésiculaire, nous ont montré que les propriétés chimiques de cette dernière seront, tout simplement, celles d'amidon dans son ensemble, et comme telles, on peut donc les considérer comme suffisamment connues. Aussi, ce qui nous occupera actuellement, ce seront plutôt ses propriétés chimico-colloïdales; pour celles-là, nous avons de bonnes raisons de croire qu'elles seront différentes non seulement des propriétés de l'amidon cru, mais également de l'empois d'amidon comme tel; nous avons vu déjà, en effet, que ces membranes ne sont constituées que par les portions les moins solubles de l'amidon. Nous pourrons nous dispenser, d'ailleurs, pour ces mêmes raisons, d'étudier les réactions chimico-colloïdales de

leurs solutions, puisque ces solutions sont identiques à celles de l'amylopectine que nous avons examinées déjà précédemment. Il ne nous restera donc qu'à déterminer les caractères de l'amylopectine (ou matière des parois vésiculaires), à l'état solide ou pseudo-solide; un examen de ses facultés d'absorption est tout indiqué à cet égard. Dans ce domaine, nous ne trouvons quelques renseignements, sur l'absorption de la tannine notamment, que dans le mémoire de Beyerinck, cité déjà à plusieurs reprises. L'absorption d'autres substances par les vésicules de l'empois n'a jamais fait l'objet de recherches; cela est vrai même pour les matières colorantes synthétiques, malgré tout l'intérêt qu'aurait une telle étude; car nous ne savons encore rien, jusqu'à présent, des rapports qui pourraient exister entre la colorabilité de nombreux hydrates de carbone, très voisins l'un de l'autre au point de vue chimique (cellulose, hydrocellulose et amidon sous ses différents aspects).

Beyerinck a montré que lorsqu'on ajoutait du tannin à une «suspension» de vésicules d'empois d'amidon, celles-ci deviennent nettement visibles; à l'intérieur des vésicules, il se forme, en même temps, un précipité qui, souvent, présente le mouvement Brownien. Il est facile de vérifier cette observation, qui se confirme également pour les vésicules provenant de l'amidon de *Canna* et de celui de la tulipe. L'amidon du froment ne se comporte pas de la même manière. Lorsqu'on ajoute du tannin à des vésicules en suspension de cet amidon, sur le verre porte-objet, on ne voit se former aucun précipité gris, opaque, à l'intérieur des vésicules dont les parois restent claires; les contours deviennent au contraire plus foncés, et on ne peut rien apercevoir d'une précipitation qui se ferait à l'intérieur des vésicules. Il semble que les vésicules de cet amidon aient une grande affinité pour le tannin; aussi, la précipitation s'opère-t-elle immédiatement, dans la paroi même, qui devient ainsi imperméable pour la solution colloïdale ambiante. On pourrait supposer aussi bien qu'un précipité pourrait se former dans la paroi poreuse de la vésicule, à la suite du contact qui s'opère

entre la solution d'amylose, très précipitable, qui s'y trouve, et la solution de tannin qui y pénètre de l'extérieur; la formation de ce précipité amènerait alors l'imperméabilité de la paroi.

Cette divergence entre l'amidon du froment et les autres amidons, au point de vue de leurs facultés d'absorption respectives, était cependant difficile à prévoir. Les manuels mentionnent simplement que le tannin précipite l'amidon, sans préciser davantage; on a même basé sur cette précipitation des méthodes de détermination quantitative de l'amidon. Les expériences que nous allons exposer maintenant sont de nature à nous engager à être prudents à cet égard.

Dans le but de vérifier les hypothèses que nous venons de formuler, nous avons examiné le pouvoir d'absorption de solutions à 1 °/₀, que nous avions fait bouillir préalablement pendant 1 heure, à l'égard de solutions de tannin et aussi de baryte; car cette dernière est absorbée également par l'amidon, et est même utilisée dans les déterminations quantitatives; nous avons observé, dans ces conditions, des solutions d'amidon pur, de pomme de terre et de froment. Les empois en furent préparés au moyen d'eau privée d'acide carbonique. La précipitation était obtenue par l'addition, aux solutions d'amidon, de volumes égaux des solutions à 1 °/₀ du réactif essayé. Nous résumons les résultats obtenus, dans le petit tableau synoptique suivant.

Solution d'amidon	Solution de tannin	Eau de baryte
de pomme de terre	La solution devient un peu plus opalescente; conservée aseptiquement, elle reste absolument translucide, même après des semaines.	Formation immédiate d'un précipité volumineux, qui se dépose rapidement.
de froment	La solution devient instantanément laiteuse. Formation rapide d'un précipité volumineux.	Pas de précipité, même au bout d'un certain temps; l'opalescence a seulement augmenté quelque peu.

Les réactions que nous résumons ci-dessus sont très caractéristiques et très nettes. Au bout d'une nuit de repos, les précipités fournis respectivement par la baryte et l'amidon de pomme de terre et par le mélange tannin-amidon de froment présentent des volumes identiques; les tubes à essai contenant respectivement les mélanges tannin-amidon de pomme de terre et baryte-amidon de froment ne nous montrent qu'une opalescence peu importante et identique des deux côtés; ces deux amidons se comportent donc de façon opposée, en présence des mêmes réactifs. La grande affinité d'absorption de l'amidon de froment pour le tannin confirme l'interprétation que nous avons donnée ci-dessus des faits observés sous le microscope. La question de savoir d'où provient cette divergence entre ces deux amidons subsiste cependant.

Nous verrons que, pour le pouvoir d'absorption, il en va de même que pour nombre d'autres propriétés de l'amidon; il est lié étroitement à la nature des électrolytes en présence.

Lorsque, à une solution d'amidon pur de pomme de terre, nous ajoutions une trace de $CaCl_2$, puis du tannin, nous voyions se former un liquide blanc, épais, qui se déposait peu à peu. Si avant d'ajouter le tannin nous faisions bouillir le liquide un instant en présence de traces de $CaCl_2$, l'adjonction de tannin, faite après refroidissement complet, produisait immédiatement un trouble abondant, dont la sédimentation etait encore plus rapide; de la sorte, le liquide avait donc acquis, dans ce cas, tous les caractères d'une solution d'amidon de froment. Il suffit de quelques milligr. de $CaCl_2$ pour rendre précipitable tout le contenu d'un tube à essai. Il va sans dire qu'une expérience de comparaison, comportant la même quantité de $CaCl_2$, mais sans amidon, resta absolument claire après adjonction de tannin; c'est la grande pureté de notre amidon de pomme de terre, absolument exempt d'ions Ca, qui est la cause de la netteté de cette expérience; c'est à l'absence de ces précautions spéciales qu'il faut attribuer le fait que ces phénomènes sont restés inobservés jusqu'à ce jour, même dans les recherches quantitatives.

Pour les divergences des réactions en présence de l'eau de baryte, nous ne voyons pas très bien, non plus, à quelle cause on pourrait les attribuer. Il semble cependant qu'il s'agirait ici d'une véritable absorption de $Ba(OH)_2$, dans laquelle la formation du sel barytique de l'acide amylophosphorique ne jouerait aucun rôle; nous avons observé en effet que la solution d'amidon de pomme de terre qui donne instantanément un précipité volumineux par adjonction d'eau de baryte, reste au contraire absolument claire si on l'additionne d'une solution de chlorure de baryum; elle ne se trouble pas, même si l'on y ajoute encore, après cela, de l'ammoniaque exempte d'acide carbonique.

Nous devons donc admettre que $Ba(OH)_2$ donne réellement des combinaisons par absorption avec l'amylophosphate de potassium, ou avec le composé de Ba qui se forme, temporairement, aux dépens de ce sel; elle n'en donnerait pas, par contre, avec les amylophosphates alcalino-terreux (calcique p. ex.) préexistant dans l'amidon. On se rappellera que ce dernier sel a des propriétés chimico-colloïdales anormales, comme nous l'avons montré déjà suffisamment au Chapitre II. Il se pourrait aussi que les divergences de la dispersité, que nous avons mentionnées au chapitre I, jouent un rôle dans ces phénomènes.

On remarquera aussi, une fois de plus, le rôle important que jouent dans les milieux colloïdaux les ions bivalents; cette influence spéciale se retrouve couramment dans le domaine de la chimie colloïdale; dans le cas de la précipitation de l'amidon par le tannin, le rôle joué par les ions Ca peut être considéré comme frappant à ce point de vue. Cet ion remplit, peut-on dire, dans cette réaction une fonction comparable à celle du mordant dans les procédés de teinture des textiles.

Nous avons fait remarquer, antérieurement déjà, qu'on ne trouve dans les auteurs aucune mention de tentatives de coloration des grains d'amidon «gélifiés», qui auraient été faites au moyen des couleurs d'aniline. Nous avons, au contraire, beaucoup de renseignements sur la colorabilité des grains crus. Outre

ces recherches, qui avaient pour objet principal la structure des grains, des travaux plus ou moins étendus ont été consacrés par Gastine, Fischer et Suida à l'étude de la question de savoir quelles matières colorantes ont de l'affinité pour l'amidon, lesquelles n'en ont pas. Gastine[1] attire, notamment, l'attention sur la grande différence de colorabilité qui existe entre l'amidon de la pomme de terre et de l'arrowroot d'une part, et l'amidon des céréales, des légumineuses et du riz d'autre part. Nous y avons fait allusion déjà, au § 2, à propos des observations d'Unna; il y a d'ailleurs corrélation, à notre avis, entre la manière dont ces divers amidons se comportent à l'égard des colorants et celle dont ils réagissent en présence du tannin. Comme nous l'avons vu ci-dessus, toutes les matières colorantes examinées sont, en effet, basiques, et par conséquent situées aux antipodes du tannin au point de vue des caractères chimico-colloïdaux; et elles présentent précisément des réactions tout opposées à celles du tannin; elles se combinent, par exemple, très facilement avec les amidons exempts de Ca.

Fischer[2] a subdivisé les matières colorantes en trois catégories: celles qui ne sont pas absorbées, celles qui sont absorbées lentement et d'une manière peu énergique, et enfin celles qui sont absorbées rapidement, et complètement, jusqu'à épuisement du liquide. Dans chacun de ces groupes, Fischer prend quelques exemples qu'il étudie spécialement; le total des couleurs ainsi examinées se monta à environ 30. Les résultats obtenus par Suida[3], qui étudia à peu près 70 colorants, en chiffres ronds, ne sont pas absolument d'accord avec ceux de Fischer. Des recherches de ces deux savants, il résulte cependant assez nettement que seuls les colorants basiques (et aussi ceux qui ne sont

---

[1] Gastine. Sur un nouveau procédé microscopique des farines — Compt. Rend. Acad Sc., 1906; CXLII; 1207.

[2] Fischer. Über die kolloïdale Natur der Stärkekörner und ihr Verhalten gegen Farbstoffe. Beih. Bot. Centralbl., 1905; XVIII, 409.

[3] Suida. Über das Verhalten von Farbstoffen gegenüber Stärke, Kieselsäure und Silikaten. Sitzungsber. Akad. Wien. 1904; CXIII. 725.

pas trop sulfonés) sont absorbés, contrairement à ce qui se passe pour les matières colorantes acides et les colorants «directs». Ce sont les recherches de Suida qui nous ont paru être les plus exactes.

La manière dont se comportent les colorants directs, c'est-à-dire ceux qui teignent la cellulose «substantivement», est tout spécialement remarquable. Suida en examina plusieurs et les classa tous dans la première catégorie, ce en quoi il est absolument d'accord avec Fischer; le bleu de diamine constitue la seule exception dans le groupe des colorants dérivés de la tétrazobenzidine.

Il semble donc qu'il y ait ici une différence importante entre ces deux hydrates de carbone (l'amidon et la cellulose); différence dont la signification est d'autant plus grande que la nature même de la teinture «substantive» du coton par les colorants directs est jusqu'à présent tout à fait inexpliquée, et reste encore plus obscure que le phénomène de la teinture en général.

Remarquons tout de suite que cette divergence importante entre l'amidon et la cellulose est toute apparente; elle n'a rien à faire avec les phénomènes d'absorption, mais est due uniquement à la structure des grains. Nous en avons acquis la preuve, par hasard, au cours d'expériences d'absorption sur l'amidon cru. Ces expériences furent exécutées à la manière des analyses capillaires, et c'est l'amidon lui-même qui servait de matière absorbante. Nous avions, pour ce faire, tamisé soigneusement notre amidon, puis distribué uniformément dans des tubes étroits, fermés inférieurement par de l'ouate. Les solutions des matières colorantes, que nous voulions examiner, étaient amenées au-dessus de l'amidon au moyen de pipettes.

Les solutions de couleurs basiques présentèrent toutes ce phénomène que nous avions, d'ailleurs, prévu: la formation, au-devant de la solution, d'une zone aqueuse, incolore, qui se déplaçait au fur et à mesure de la descente de la solution dans le tube; les solutions acides descendaient régulièrement tout en colorant l'amidon; la solution du rouge Congo, par contre,

présenta, nous semble-t-il, un phénomène d'absorption négative très prononcée, de sorte que les couches inférieures étaient colorées beaucoup plus intensément que les couches supérieures. L'absorption négative est un phénomène que l'on observe rarement, et on ne pouvait nullement s'attendre à le rencontrer chez une substance qui abaisse, autant que le rouge Congo, la tension superficielle; c'est pourquoi nous avons voulu le soumettre à un examen plus approfondi. Nous avons donc traité l'amidon de pomme de terre par une solution à 1°/₀ de rouge Congo, en quantité exactement suffisante pour obtenir, après centrifugation énergique, une mince couche de liquide surnageante; il apparut alors que ce liquide avait pris une coloration beaucoup plus foncée que celle de la solution primitive; il n'était pas possible, d'autre part, de lui rendre, par dilution, sa teinte primitive. Celle-ci s'était modifiée et avait fait place à une teinte brune. L'addition d'un alcali faisait réapparaître une coloration rouge de la même intensité que celle de la solution dont nous étions parti. On pouvait imiter cette teinte brune en additionnant la solution de rouge Congo pure d'une petite quantité d'acide acétique. Les grains d'amidon n'enlèvent donc pas le rouge Congo à sa solution, mais provoquent la formation de bleu Congo; une expérience de contrôle, exécutée au moyen d'eau distillée, nous montra que les grains d'amidon n'avaient pas abandonné d'acide à la solution. La seule manière d'expliquer ces faits, c'est d'admettre que les produits de la dissociation hydrolytique du rouge Congo sont séparés l'un de l'autre par l'action de l'amidon, par un processus analogue à l'hydrolyse de la membrane[1], étudiée par Donnan; dans ce cas la séparation est opérée, comme on sait, par la présence d'une paroi sémi-perméable, qui laisse diffuser l'un des composants et qui retient l'autre. Dans le cas qui nous occupe, les lamelles résistantes des grains d'amidon se comportent comme les membranes d'un dialysateur, qui laissent passer NaOH et retiennent le rouge Congo.

[1] Cf. Donnan, Zeitschr. f. Elektrochemie, 1911, XVII, 572.

La non-coloration des grains d'amidon par le rouge Congo est bien dûe uniquement à l'imperméabilité des parois des grains pour l'ion chromogène; ce qui le prouve, c'est que les grains, dont les lamelles ont été endommagées mécaniquement, prennent une belle teinte rouge, quand on les traite par le rouge Congo. Il est ainsi établi que le degré de dispersité du colorant exerce une grande influence sue la coloration des grains d'amidon; il nous reste, néanmoins, à fournir la preuve qu'il ne s'agit pas d'une particularité propre au rouge Congo, mais que d'autres matières colorantes, à degré colloïdal élevé, présentent les mêmes phénomènes. Il nous sera permis sans doute de supposer qu'en règle générale les expérimentateurs qui nous ont précédé n'ayant pas tenu compte de ce facteur, les résultats obtenus par eux en ont pu être quelque peu faussés et devraient subir, éventuellement, certaines corrections; c'est pourquoi nous avons estimé devoir faire entrer également l'amidon cru dans le cadre de nos vérifications; nous avons eu soin de rendre au préalable les lamelles suffisamment perméables pour les colorants, en broyant finement les grains, de la manière indiquée plus haut. Sous le microscope le pouvoir d'absorption se manifeste le plus rapidement possible, lorsqu'on fait couler latéralement la solution du colorant sur la préparation des grains d'amidon broyés ou sur les parois vésiculaires. Si ce pouvoir d'absorption est positif, on observe une accumulation de la matière colorante dans ces corpuscules; dans la zone de diffusion, où la concentration du colorant est la plus faible, il y a, au contraire, épuisement du bain colorant. Pour nos expériences, nous avons pris dans tous les groupes de la classification des matières colorantes synthétiques.

Le nombre total des matières colorantes essayées s'éleva à 60. Nous avons examiné plus spécialement les colorants directs, dont une vingtaine furent étudiés par nous. Les vésicules d'amylopectine furent préparées par une gélification de courte durée en partant d'amidon de pomme de terre et de froment. Les deux amidons se comportent absolument de la même manière en présence des colorants que nous avons utilisés; dans un seul cas,

il nous a semblé que les vésicules d'amidon de froment se coloraient plus intensément par la deltapurpurine que celles de la pomme de terre.

Nous donnons ci-après un tableau synoptique des résultats obtenus dans nos essais de coloration; le signe + indique que le colorant est absorbé, sans préjuger d'ailleurs de l'intensité de la coloration; le signe — signifie que nous n'avons pu constater aucune affinité de l'amidon pour le colorant.

Colorant	Grains d'amidon endommagés mécaniquement	Vésicules d'amylopectine
Colorants nitrés		
Ac. picrique	—	—
Jaune de Martius	—	—
Jaune de Naphton S.	—	—
Colorants azoïques		
Col. Monoazoïques		
Hélianthine	—	—
Orange G.	—	—
Chrysoïdine	+	—
Brun de Bismarck	+	—
Crocéine orange	—	—
Ponceau 6 R.	—	—
Bordeaux G.	—	—
Col. diazoïques		
Crocéine brillante	+	+
„Tuchrot"	—	—
Ecarlate de Biebrich	très faible	très faible
—		
Jaune brillant	+	+
Chrysophénine	+	+
Jaune direct.	+	+
—		
Benzo-rouge	+	+
—		
Benzo-azurine	—	—

Colorant	Grains d'amidon endammagés mécaniquement	Vésicules d'amylopectine
Benzo-bleu 2 B.	+	+
Benzo-orange	+	+
Benzo-olive	+	+
Benzo-purpurine	+	+
Benzo-bleu-noir	+	+
Chrysamine	+	+
Rouge Congo	+	+
Orange Congo	+	+
Purpurine brillante	+	+
Benzo-vert brillant	+	+
Deltapurpurine	+	+
Bleu direct	+	+
Noir direct	+	+
Orange de Toluylène	+	+
Colorants acétoniques		
Col. carbonyliques		
Hématéine	—	—
Acide Carminique NH_4	—	—
Jaune de Quinoline	—	—
Colorants acétonimidiques		
Primuline	—	—
Colorants de l'indigo		
Carmin d'indige	—	—
Colorants Quinoniques		
Col. de l'anthracène		
purpurine (sel potassiq.)	—	—
Cyanine (alcool faible)	—	—
Colorants de la Quinonimide		
Bleu de Crésyle brillant	+	—
Rouge de Magdala	+	—
Bleu de méthylène	+	—
Bleu neuf (Neu blau)	+	—

Colorant	Grains d'amidon endommagés mécaniquement	Vésicules d'amylopectine
Rouge neutre	+	—
Nigrosine	—	—
Safranine	+	—
Colorants de la méthylènequinone (triphénylméthane)		
Erythrosine	+	—
Eosine	—	—
Coralline	+	—
Fuchsine	+	—
Fuchsine acide	—	—
Vert de malachite	+	—
Vert acide	—	—
Vert d'iode	—	—
Violet de Gentiane (violet de méthyle)	+	—
Violet acide	très faible	—
Bleu d'eau	+	—
Bleu de coton	très faible	—
Bleu de toluidine	—	—

Ainsi que le montre ce tableau, le traitement mécanique préalable auquel ont été soumis les grains d'amidon n'a eu d'influence que pour les couleurs diazoïques. Pour tous les autres colorants, la réaction que nous avons obtenue est celle indiquée déjà par Suida; les seules couleurs capables de colorer l'amidon sont les couleurs basiques, qui appartiennent aux groupes du triphénylméthane, de la quinonimide et au groupe monoazoïque. Le gonflement des grains, cependant, supprime cette affinité, comme le montre le tableau; cette particularité est, au surplus, très remarquable, attendu que l'amidon ne perd pas son caractère acide à la suite de la «gélification»; il est probable que son caractère colloïdal ne diminue pas davantage. Les résultats obtenus au chapitre I ne faisaient pas prévoir cette anomalie; il

ne semblerait pas que celle-ci puisse être compatible avec la grande affinité que presque tous les colorants directs ont pour les vésicules d'empois; cette affinité est apparemment plus énergique encore à l'égard des vésicules d'empois qu'à l'égard de l'amidon cru. Quoi qu'il en soit, nous voudrions en conclure que la théorie chimique actuelle concernant la coloration est insuffisante; nous aurions tort de vouloir expliquer celle-ci uniquement en admettant qu'il y aurait formation d'un sel aux dépens de la couleur basique agissant sur un substrat acide.

Le tableau ci-dessus nous apprend encore que, dans la catégorie des couleurs diazoïques, les colorants du groupe du stilbène (jaune brillant et autres), le benzo-rouge véritable (une couleur du groupe acide, iodé), et celles du groupe de la benzidine teignent aussi bien l'amidon cru que l'empois. Seule la benzo-azurine (un dérivé de la tétrazo-anisidine, qui teint bien le coton directement) est inactive, ce en quoi elle se rapproche de la primuline. Ces deux couleurs ont un caractère colloïdal très prononcé, de sorte que cette manière de se comporter s'explique difficilement. Un stade intermédiaire particulier est représenté par les colorants diazoïques secondaires. Ceux-ci ne teignent pas le coton, tandis qu'ils colorent l'amidon suivant une progression ascendante: le «Tuchrot» est complètement inactif, tandis que l'écarlate de Biebrich a pour les grains d'amidon gélifiés ou broyés une affinité faible et que la crocéine brillante exerce sur ceux-ci une action énergique. Suida avait classé ce dernier colorant parmi les couleurs inactives.

Les couleurs du groupe de la benzidine sont de bons colorants, mais leur affinité n'est pas la même dans tous les cas. En outre du rouge Congo et de l'orange Congo, ce sont surtout la purpurine brillante et le bleu direct qui se montrent éclatants dans leurs effets. Dans le cas de grains gonflés unilatéralement (d'un côté seulement) (cf. § 3), ces couleurs ne parviennent pas à pénétrer jusque dans la portion non gélifiée du grain: nous pouvons donc admettre que les lamelles les plus internes demeurent imperméables aux couleurs faiblement disperses. Cette

particularité nous fournit le moyen de faire apparaître nettement ces grains à moitié gélifiés dans les préparations. La safranine, par exemple, colore en rouge intense les portions inaltérées des grains, tandis que la partie qui a gonflé reste incolore. Le rouge Congo, à son tour, donne précisément une belle teinte rouge aux portions gonflées, qui ressortent alors très nettement à côté de la partie non modifiée des grains.

Lorsqu'on colore les grains d'amidon broyés au moyen de colorants appartenant au groupe de la benzidine, c'est bien le côté acide du colorant qui réagit pour amener la coloration; la base qui s'y trouve combinée n'intervient pas, et ne donne lieu à aucune complication des phénomènes; pour le démontrer nous avons utilisé une solution de bleu Congo. Nous avions préparé celui-ci en précipitant le rouge Congo par un acide, puis en lavant le précipité jusqu'à ce qu'il soit capable de former, dans son entièreté, une solution colloïdale. Ce colloïde négatif ne donne pas de produit d'absorption bleu avec l'amidon broyé; il se combine, au contraire, complètement avec l'amidon, sous sa forme rouge: on serait tenté de conclure à la formation d'un sel, plutôt qu'à une absorption mécanique ou électrique, et cela d'autant plus volontiers qu'en présence d'un colloïde positif, tel que l'hydroxyde d'aluminium, le bleu Congo donne parfaitement un précipité bleu. Cette dernière combinaison par absorption devient rouge quand on la chauffe, à la suite, pense-t-on, de la combinaison chimique des composants (Bayliss, 1911). Si l'on voulait conclure de ces faits que le bleu Congo forme avec l'amidon une combinaison chimique véritable, il conviendrait cependant de remarquer que cette combinaison est instable et dissociable par l'eau, si celle-ci est présente en grande quantité; tel est le cas qui se présente pour la combinaison Congo-coton, dans laquelle la couleur ne se fixe définitivement que si on chauffe à 100°, en présence de sels; il se produit là des modifications, inconnues jusqu'à présent, dans les soudures et liaisons chimiques.

Nous avons encore eu l'occasion de constater que si l'on ajoute

préalablement un peu d'oléate sodique à la solution du rouge Congo, le colorant ne réagit plus ni sur l'amidon, ni sur les vésicules: ce fait semble indiquer qu'il existe des cas spéciaux, des particularités dans les phénomènes d'absorption; nous pouvons le rapprocher de l'observation faite par Biltz à propos de l'action de la benzopurpurine sur le coton; cette réaction correspondrait, d'après lui, à une courbe d'absorption identique à celle qui a été observée lorsqu'on utilise des colloïdes minéraux, tels que le bleu de molybdéne ou l'argent[1].

§ 7. Conclusion.

De tout ce qui a été exposé dans les premiers paragraphes du présent chapitre, il résulte clairement que les arguments qui ont été apportés en faveur de l'existence, autour des grains d'amidon, d'une couche externe autonome, résistante, de constitution chimique différant ou non du contenu de ceux-ci, ne peuvent soutenir la critique. Les diverses observations microscopiques que l'on a fait valoir en faveur de cette thèse sont susceptibles d'interprétations différentes. De la même manière, les manteaux en forme de vésicules enveloppant les grains d'amidon en voie de gélification, décrits par Beyerinck, ne doivent pas nécessairement être considérés comme une couche externe fortement imbibée; en y regardant de plus près et en observant soigneusement le processus du gonflement, on voit clairement qu'il ne s'agit ici que d'une confluence des membranes résistantes d'amylopectine, entre lesquelles l'amylose a disparu.

Ces vésicules ayant été très peu étudiées jusqu'ici, nous en avons recherché la composition et les propriétés. La teneur de ces vésicules en acide phosphorique ne se montra pas suffisamment plus élevée que celle qui correspond au grain tout entier, pour que nous puissions en conclure que l'acide amylophosphorique n'existe, uniquement, que dans les lamelles résistantes.

[1] Biltz. Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1905; XXXVIII, 2963.

C'est pourquoi il semble préférable de considérer plutôt l'amylopectine comme une forme chimico-colloïdale spéciale de l'acide amylophosphorique, qui se serait produite sous l'influence de certain cations (Chap. I) ainsi que des forces moléculaires superficielles.

Par leurs caractères, les produits de la gélification de l'amidon s'écartent notablement et de l'amidon et de la cellulose. Les couleurs basiques ne manifestent plus aucune affinité pour la matière dont sont formées les parois vésiculaires. Au surplus, nous avons montré qu'il existe réellement des rapports étroits entre l'amidon et la cellulose, par l'observation des réactions des colorants directs à leur égard; ces derniers constituent, comme on l'a vu, de bons colorants pour l'amidon, à la condition que l'on tienne compte de leur dispersité faible, et qu'avant de faire agir les couleurs en question on broye les grains. Nous avons, enfin, étudié l'absorption de la baryte et du tannin. Nous avons constaté que l'absorption du tannin se trouve placée sous la dépendance de la nature des électrolytes en présence et que l'amidon exempt de Ca ne précipite pas. Nous attirons encore l'attention sur ce fait singulier, afin de prévenir les erreurs qui pourraient éventuellement se produire dans les dosages séparatifs.

CHAPITRE IV.

Récapitulation et Résultats.

Un désaccord a pris naissance, au cours de ces dernières années, entre les auteurs, au sujet de la question de savoir si les grains naturels, non modifiés des divers amidons sont attaqués également vite par les solutions d'amylase; ces divergences d'opinion ont été le point de départ d'une série de recherches, que nous avons relatées dans notre introduction; elles confirment la manière de voir des auteurs qui avaient affirmé que les amidons différents, provenant de familles végétales différentes, se comportent de façon très différente l'un de l'autre. Ce point établi, la nécessité se faisait sentir de rechercher d'une façon plus précise quelle était la cause des divergences existant entre les diverses espèces d'amidon à l'égard de cette très importante réaction. Une telle étude était d'un grand intérêt, au point de vue de la biologie comme aussi de la physiologie, car elle devait contribuer à compléter nos connaissances (encore si imparfaites malgré les écrits si nombreux qui y ont été consacrés) dans la question de l'amidon en général.

D'après les opinions généralement reçues, chaque grain d'amidon serait entouré d'une couche réfractaire, qui protégerait le grain contre les influences extérieures; cette couche extérieure serait arrivée, dans les différents cas, à un développement plus ou moins avancé. Des preuves diverses ont été données de l'existence de cette couche; et parmi elles, on a prétendu rendre cette couche directement visible à l'aide des méthodes par coloration; malgré cela, on ne sait rien de certain au sujet de sa constitution.

De la sorte, la matière de la membrane est assimilée tour à tour, par les auteurs, à l'amylose ou à l'amylopectine ou à des incrustations de diverses autres substances (albumines, tannin). Nous avons examiné soigneusement ces diverses interprétations, au Chapitre III; nous avons abouti à cette conclusion que ces soi-disant preuves reposent, en grande partie, sur des erreurs. Si tant est que les grains soient vraiment enveloppés d'une couche résistante, nous n'avons pu réussir à prouver que cette couche différait des lamelles résistantes du même grain, qui correspondent à la structure visiblement stratifiée de ceux-ci; nous n'avons pu conclure définitivement, ni au point de vue des caractères, ni au point de vue de la constitution; il en résulte que les hypothèses de Beyerinck et de Jentys doivent être abandonnées.

Nous avons, d'autre part, trouvé l'occasion d'attirer l'attention sur deux points de vue absolument nouveaux, qui permettront d'étudier la question de l'inégalité des vitesses d'attaque des différents amidons par l'amylase. Nous avons constaté, en premier lieu, que le degré de dispersité de l'amylose, contenue dans les grains d'amidon naturels intacts, est très différent d'une espèce d'amidon à l'autre. Les amidons facilement attaquables par les ferments amylolytiques sont formés d'une matière à dispersion élevée et très active: c'est, notamment, l'amylose qui se colore en bleu pur par l'iode, et qui fait presque complètement défaut dans l'amidon de pomme de terre par exemple; l'amidon de froment contient au moins 10% de cette substance très «disperse». On observe, en règle générale, qu'il existe un rapport de proportionnalité entre la quantité de cette substance et la digestibilité des grains par les ferments. Lorsqu'on prépare les solutions à chaud, cette amylose, à dispersité élevée, disparaît complètement; il n'existe, toutefois, aucun rapport direct démontrable entre la «gélification» proprement dite et l'augmentation de volume des molates dont nous venons de parler. C'est un fait très remarquable et difficile à expliquer que cette modification du degré de dispersité ne se produit qu'en présence des

autres éléments constituants de l'amidon; à l'état isolé, l'amylose à dispersité élevée conserve ce caractère même après ébullition. En attendant, cette modification nous explique suffisamment bien que les empois provenant d'amidons différents puissent réagir avec des vitesses à peu près identiques à l'égard de l'amylase. Nos expériences ont été exécutées sur les amidons de la pomme de terre, du *Canna*, du froment et de la tulipe; la dispersité fut déterminée au moyen d'ultrafiltres, sous la forme de membranes de collodion de perméabilité déterminée; nous avons indiqué à cette occasien une nouvelle méthode de préparation de ceux-ci.

Le deuxième facteur qui a retenu notre attention plus spéciale, c'est la lamellation des grains; ce caractère est très important, non seulement au point de vue de l'attaque par l'amylase, en particulier, mais encore à l'égard de toute la manière d'être et de se comporter de l'amidon en général. La structure lamellaire diffère d'un amidon à l'autre, plutôt par la forme et la nature même que par le nombre des lamelles. Nous avons montré que la visibilité comme aussi la résistance de ces lamelles sont des fonctions de la nature des électrolytes qui entrent dans la composition de l'amidon. Ces électrolytes ne sont pas, en effet, identiques chez tous les amidons; ce seraient, avant tout, les cations qui auraient une influence prépondérante à ce point de vue. L'anion que l'on retrouve dans les cendres est le même pour toutes les espèces d'amidon (PO_4): il joue un rôle très important, car il forme avec l'amidon une combinaison organique, l'acide amylophosphorique, ce qu'on savait d'ailleurs déjà: nous avons toutefois mis en avant l'hypothèse que ce dernier acide n'est pas identique à l'amylopectine (Samec), mais qu'il ne prendrait les caractères de l'amylopectine qu'après s'être combiné avec un cation; ce serait, de plus, la nature de ce dernier qui déciderait des propriétes chimico-colloïdales de l'amylopectine en question. Le cation K amènerait une agglutination facile, et conséquemment une perméabilité moins grande des lamelles; si c'est au contraire Ca, il se produit une floculation poussée plus loin, tandis que l'agglutination est bien moins complète.

Une amylopectine ainsi constituée fournit naturellement des solutions plus troubles, moins visqueuses; les grains se désagrègent plus rapidement et sont plus facilement perméables pour les solutions d'amylase; la corrosion s'opère suivant un schéma différent: il se forme notamment des galeries d'érosion. Nous avons constaté que l'amidon de pomme de terre pur ne contient aucune trace de Ca, tandis que l'amidon de froment pur ne contient pas de K; quant aux autres amidons examinés, ils occupent une place intermédiaire entre les deux premiers, tant au point de vue de la nature des électrolytes qu'au point de vue des caractères. Nous avons émis l'hypothèse que la lamellation doit son origine à une agglutination d'agrégats superficiels; ceux-ci seraient formés, sous l'influence des forces moléculaires, aux dépens des composants des produits de sécrétion du plastide, qui abaissent le plus la tension superficielle; ce phénomène se reproduirait chaque fois qu'une surface, nouvellement formée, se trouve pendant quelque temps à l'état de repos. Il est improbable que les ferments jouent un rôle dans l'apparition de la lamellation, qu'il s'agisse d'ailleurs de ferments amylolytiques ou de ferments coagulants de l'amidon; pour ces derniers nous doutons, au surplus, fortement de leur existence même. Aussi bien nous avons pu donner une autre interprétation de la coagulation de l'amidon: celle-ci devrait être considérée comme une amylolyse qui serait considérablement enrayée.

La nature des électrolytes de l'amidon se montra — contrairement à notre attente — tout aussi décisive au point de vue des propriétés d'absorption de l'amidon, notamment à l'égard du tannin. Nous avons constaté que cette substance ne précipite pas les solutions d'amidon absolument exempt de Ca, alors que les solutions d'amidon qui contiennent Ca donnent, avec ce même réactif, un précipité volumineux. C'est bien la faible quantité de Ca, contenue dans l'amidon (l'amidon de froment contient 0,08‰ de CaO) qui provoque la précipitation de l'amidon par le tannin; nous avons établi ce fait en ajoutant des traces de $CaCl_2$ à de l'amidon normalement exempt de Ca (nous avions

choisi l'amidon de pomme de terre); on peut obtenir la précipitation en présence du tannin. Nous attirons sur cette particularité l'attention des chimistes-analystes, car cette réaction du tannin est utilisée, comme on sait, pour séparer la dextrine de l'amidon au sein d'une solution.

L'absorption des couleurs synthétiques dépend, dans une mesure moindre, de la nature des cations de l'amidon. On peut cependant se rendre compte, très nettement, de ce que les couleurs basiques ont beaucoup moins d'affinité pour les amidons qui contiennent Ca, que pour ceux qui en sont exempts; par ce caractère, ces colorants se montrent, une fois de plus, les antipodes chimico-colloïdaux du tannin. Nous avons voulu examiner de plus près les propriétés des parois des vésicules d'amylopectine des grains d'amidon gélifiés, ainsi que les rapports qu'elles pourraient avoir avec les grains de l'amidon naturel, non modifié, ainsi qu'avec la cellulose, au point de vue chimico-colloïdal; nous avons étudié, dans ce but, le pouvoir d'absorption pour un grand nombre de matières colorantes.

Ces expériences nous ont permis de constater que les couleurs basiques perdent leur affinité d'absorption pour les grains d'amidon, dès que ceux-ci subissent un commencement de gélification; c'est précisément en ce moment que les colorants appartenant au groupe de la benzidine et du stilbène commencent, au contraire, à se montrer très actifs. L'affirmation que ces colorants «directs» n'ont pas d'affinité pour l'amidon (Fischer, Suida) repose sur une erreur; l'amidon cru lui-même peut être coloré par ces colorants acides, à condition que l'on ait préalablement détruit les grains par quelque procédé mécanique; si l'on néglige cette précaution, l'hydrolyse de la membrane intervient, grâce à l'imperméabilité des lamelles pour l'ion chromogène de ces couleurs, dont la dispersité est relativement faible.

Vu la grande affinité des colorants direct pour l'amidon — sous l'un comme sous l'autre des deux aspects qu'il peut présenter — il est évident que celui-ci est beaucoup plus voisin de la cellulose qu'on ne l'avait cru jusqu'ici.

Table des matières.

Amsterdam, Laboratoire de physiologie végétale de l'Université.